

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 26 APR 2000

WIPO PCT

JP00/9295

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年12月24日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第368097号

出 願 人

Applicant(s):

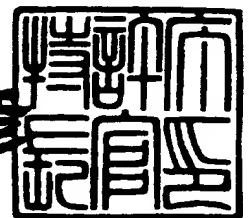
味の素株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月10日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3015854

【書類名】 特許願

【整理番号】 P-6958

【提出日】 平成11年12月24日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12P 13/06

【発明の名称】 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

【請求項の数】 22

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

 【氏名】 郡司 義哉

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

 【氏名】 安枝 寿

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

 【氏名】 杉本 慎一

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

 【氏名】 辻本 信晴

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 - 1 味の素株式会社発酵
技術研究所内

 【氏名】 島岡 恵

【特許出願人】

 【識別番号】 000000066

【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089244

【弁理士】

【氏名又は名称】 遠山 勉

【選任した代理人】

【識別番号】 100090516

【弁理士】

【氏名又は名称】 松倉 秀実

【選任した代理人】

【識別番号】 100100549

【弁理士】

【氏名又は名称】 川口 嘉之

【連絡先】 03-3669-6571

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第103143号

【出願日】 平成11年 4月 9日

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成11年特許願第169447号

【出願日】 平成11年 6月16日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 012092

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9117157

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。

【請求項2】 L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン又はL-イソロイシンである請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項3】 L-アミノ酸アナログ耐性又はL-アミノ酸要求性を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項4】 L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項5】 ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する請求項1記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項6】 さらにアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素から選ばれる1種、2種又は3種の活性が増強された請求項5記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項7】 L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された請求項5記載のメチロフィラス属細菌。

【請求項8】 メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである請求項1～7のいずれか一項に記載の細菌。

【請求項9】 請求項1～8のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。

【請求項10】 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする請求項9記載の方法。

【請求項11】 請求項1～8のいずれか一項に記載のメチロフィラス属細菌

菌を培地に培養し、該細菌の菌体中にL-アミノ酸を生産蓄積させることを特徴とする、L-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

【請求項12】 L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン又はL-イソロイシンである請求項11記載のメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

【請求項13】 下記(A)又は(B)に示すタンパク質をコードするDNA。

(A) 配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項14】 下記(a)又は(b)に示すDNAである請求項13記載のDNA。

(a) 配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列を含むDNA。

(b) 配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項15】 下記(C)又は(D)に示すタンパク質をコードするDNA。

(C) 配列番号8に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号8に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質。

【請求項16】 下記(c)又は(d)に示すDNAである請求項15記載のDNA。

(c) 配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列を含むDNA。

(d) 配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードするDNA。

【請求項 17】 下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号 10 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 18】 下記 (e) 又は (f) に示す DNA である請求項 17 記載の DNA。

(e) 配列番号 9 の塩基番号 1268～2155 からなる塩基配列を含む DNA。

(f) 配列番号 9 の塩基番号 1268～2155 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 19】 下記 (G) 又は (H) に示すタンパク質をコードする DNA。

(G) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(H) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 20】 下記 (g) 又は (h) に示す DNA である請求項 19 記載の DNA。

(g) 配列番号 11 の塩基番号 2080～2883 からなる塩基配列を含む DNA。

(h) 配列番号 11 の塩基番号 2080～2883 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【請求項 21】 下記 (I) 又は (J) に示すタンパク質をコードする DNA。

(I) 配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(J) 配列番号 14 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

【請求項 22】 下記 (i) 又は (j) に示す DNA である請求項 21 記載の DNA。

(i) 配列番号 13 の塩基番号 751～1995 からなる塩基配列を含む DNA

(j) 配列番号 13 の塩基番号 751～1995 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微生物工業に関連したものであり、詳しくは、発酵法による L-アミノ酸の製造法、及び同製造法に用いる微生物に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-バリン及び L-フェニルアラニン等のアミノ酸は、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、バチルス属、エシェリヒア属、ストレプトミセス属、シュドモナス属、アースロバクター属、セラチア属、ペニシリウム属、キャンディダ属等に属する微生物を用いた発酵法により工業生産されている。これらの微生物は、生産性を向上させるために、自然界から分離した菌株または該菌株の人工変異株が用いられている。また、組換え DNA 技術により L-グルタミン酸の生合成酵素を増強することによって、L-グルタミン酸の生産能を増加させる種々の技術が開示されている。

【0003】

上記のような微生物の育種や製造法の改良により、L-アミノ酸の生産性はかなり高まってはいるが、今後の需要の一層の増大に応えるためには、さらに安価

かつ効率的なL-アミノ酸の製造法の開発が求められている。

【0004】

ところで、従来、安価に大量に入手可能な発酵原料であるメタノールから発酵法によりアミノ酸を製造する方法としては、アクロモバクター属およびシュードモナス属（特公昭45-25273号公報）、プロタミノバクター属（特開昭49-125590号公報）、プロタミノバクター属及びメタノモナス属（特開昭50-25790号公報）、ミクロサイクラス属（特開昭52-18886号公報）、メチロバチルス属（特開平4-91793号公報）、バチルス属（特開平3-505284号公報）などに属する微生物を用いる方法が知られている。

【0005】

しかし、これまでメチロフィラス属細菌を用いてL-アミノ酸を製造することは知られていない。また、組換えDNAを用いたメチロフィラス属細菌の形質転換方法として、EP 0 035 831 A、EP 0 037 273 A、EP 0 066 994 Aが知られているが、メチロフィラス属細菌のアミノ酸の生産性の改善に組換えDNA技術が適用された例は知られていない。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規なL-アミノ酸生産菌及び同生産菌を用いたL-アミノ酸の製造法を提供することを課題とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を重ねた結果、メチロフィラス属細菌がL-アミノ酸の製造に適していることを見出した。さらに、従来、メチロフィラス属細菌の栄養要求性変異株を得ることは困難であるとされてきた（FEMS Microbiology Rev. 39, 235-258 (1986)、Antonie van Leeuwenhoek 53, 47-53 (1987)）が、本発明者らは同細菌の栄養要求性変異株を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち本発明は、以下のとおりである。

- (1) L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌。
- (2) L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン又はL-イソロイシンである(1)のメチロフィラス属細菌。
- (3) L-アミノ酸アナログ耐性又はL-アミノ酸要求性を有する(1)のメチロフィラス属細菌。
- (4) L-アミノ酸生合成系酵素の活性が増強された(1)のメチロフィラス属細菌。
- (5) ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強され、L-リジン生産能を有する(1)のメチロフィラス属細菌。
- (6) さらにアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素から選ばれる1種、2種又は3種の活性が増強された(5)のメチロフィラス属細菌。
- (7) L-リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強された(5)のメチロフィラス属細菌。
- (8) メチロフィラス属細菌がメチロフィラス・メチロトロファスである(1)～(7)のいずれかの細菌。
- (9) 前記(1)～(8)のいずれかに記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にL-アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からL-アミノ酸を採取することを特徴とするL-アミノ酸の製造法。
- (10) 前記培地がメタノールを主たる炭素源とすることを特徴とする(9)の方法。
- (11) 前記(1)～(8)のいずれかに記載のメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該細菌の菌体中にL-アミノ酸を生産蓄積させることを特徴とする、L-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体の製造法。
- (12) L-アミノ酸がL-リジン、L-バリン、L-ロイシン又はL-イソロイシンである(11)記載のメチロフィラス属細菌菌体の製造法。

【0009】

(13) 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質。

(14) 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である (13) の DNA。

(a) 配列番号 5 の塩基番号 510～1736 からなる塩基配列を含む DNA

(b) 配列番号 5 の塩基番号 510～1736 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパルトキナーゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【0010】

(15) 下記 (C) 又は (D) に示すタンパク質をコードする DNA。

(C) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(D) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質。

(16) 下記 (c) 又は (d) に示す DNA である (15) の DNA。

(c) 配列番号 7 の塩基番号 98～1207 からなる塩基配列を含む DNA。

(d) 配列番号 7 の塩基番号 98～1207 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA

【0011】

(17) 下記 (E) 又は (F) に示すタンパク質をコードする DNA。

(E) 配列番号 10 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(F) 配列番号 10 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジ

ヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質。

(18) 下記 (e) 又は (f) に示す DNA である (17) の DNA。

(e) 配列番号 9 の塩基番号 1268～2155 からなる塩基配列を含む DNA。

(f) 配列番号 9 の塩基番号 1268～2155 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【0012】

(19) 下記 (G) 又は (H) に示すタンパク質をコードする DNA。

(G) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(H) 配列番号 12 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質。

(20) 下記 (g) 又は (h) に示す DNA である (19) の DNA。

(g) 配列番号 11 の塩基番号 2080～2883 からなる塩基配列を含む DNA。

(h) 配列番号 11 の塩基番号 2080～2883 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【0013】

(21) 下記 (I) 又は (J) に示すタンパク質をコードする DNA。

(I) 配列番号 14 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(J) 配列番号 14 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質。

(22) 下記 (i) 又は (j) に示す DNA である (21) の DNA。

(i) 配列番号 13 の塩基番号 751～1995 からなる塩基配列を含む DNA。

(j) 配列番号 13 の塩基番号 751～1995 からなる塩基配列又はその一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を有するタンパク質をコードする DNA。

【0014】

尚、本明細書において「L-アミノ酸生産能」とは、本発明の微生物を培地に培養したときに、培地中に有意な量の L-アミノ酸を蓄積する能力、又は菌体中のアミノ酸含量を増加させる能力をいう。

【0015】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

<1>本発明の微生物

本発明の微生物は、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌である。本発明のメチロフィラス属細菌としては、例えばメチロフィラス・メチロトロファス (*Methylophilus methylotrophus*) AS1 株 (NCIMB10515) 等が挙げられる。メチロフィラス・メチロトロファス AS1 株 (NCIMB10515) は、ナショナル・コレクション・オブ・インダストリアル・アンド・マリン・バクテリア (National Collections of Industrial and Marine Bacteria、住所 NCIMB Ltd., Torry Research Station 135, Abbey Road, Aberdeen AB9 8DG, United Kingdom) から入手可能である。

【0016】

本発明により生産される L-アミノ酸としては、L-リジン、L-グルタミン酸、L-スレオニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン等が挙げられる。生産されるアミノ酸は 1 種類でもよく、2 種又は 3 種以上であってもよい。

【0017】

L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌は、メチロフィラス属細菌の野生株に L-アミノ酸生産能を付与することにより取得され得る。L-アミノ酸生産能を付与するには、栄養要求性変異株、L-アミノ酸アナログ耐性株、又は代謝制御変異株の取得、L-アミノ酸生合成系酵素が増強された組換え株の創

製等、従来、コリネ型細菌又はエシェリヒア属細菌等の育種に採用されてきた方法を適用することができる（アミノ酸発酵、（株）学会出版センター、1986年5月30日初版発行、第77～100頁参照）。アミノ酸生産菌の育種において、付与される栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質は、単独でもよく、2種又は3種以上であってもよい。また、増強されるL-アミノ酸生合成系酵素も、単独であっても、2種又は3種以上であってもよい。さらに、栄養要求性、L-アミノ酸アナログ耐性、代謝制御変異等の性質の付与と、L-アミノ酸生合成系酵素の増強が組み合わされてもよい。

【0018】

例えば、L-リジン生産菌は、L-ホモセリン、又はL-スレオニン及びL-メチオニンを要求する変異株（特公昭48-28078号、特公昭56-6499号）、イノシトールまたは酢酸を要求する変異株（特開昭55-9784号、特開昭56-8692号）、又はオキサリジン、リジンハイドロキサメート、S-（2-アミノエチル）-システイン、 γ -メチルリジン、 α -クロロカプロラクタム、DL- α -アミノ- ϵ -カプロラクタム、 α -アミノ-ラウリルラクタム、アスパラギン酸-アナログ、スルファ剤、キノイド、又はN-ラウロイルロイシンに耐性を有する変異株として育種することができる。

【0019】

また、L-グルタミン酸生産菌はオレイン酸要求変異株等として、L-スレオニン生産菌は α -アミノ- β -ヒドロキシ吉草酸耐性変異株として、L-ホモセリン生産菌はL-スレオニン要求変異株又はL-フェニルアラニンアナログ耐性変異株として、L-フェニルアラニン生産菌は、L-チロシン要求変異株として、L-イソロイシン生産菌はL-ロイシン要求変異株として、L-プロリン生産菌は、L-イソロイシン要求変異株として、育種することができる。

さらに、後記実施例に示すように、分岐鎖アミノ酸（L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン）の1種又は2種以上を生産する菌株は、カザミノ酸要求株として取得され得る。

【0020】

本発明者は、メチロフィラス属細菌から変異株を取得するために、まずストレ

プトマイシン耐性株の出現頻度を指標に最適な変異処理条件を詳細に検討した。その結果、変異処理後の生存率が約0.5%となる条件のとき、ストレプトマイシン耐性株の出現頻度が最高となり、この条件により栄養要求株を取得することに成功した。また、変異株のスクリーニングもこれまでE. coli等で行われているよりも大幅にスケールアップして行うことにより、困難とされてきた栄養要求株の取得に成功した。

上記のように、変異株取得に好適な条件でメチロフィラス属細菌を変異処理することにより変異株の取得が可能であることが判明したので、変異処理方法に応じて変異処理後の生存率が約0.5%となるような条件を適宜設定することにより、所望の変異株を取得することが容易となる。

【0021】

メチロフィラス属細菌から変異株を得るための変異処理としては、紫外線照射、またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。また、メチロフィラス属細菌の自然突然変異株を選択することによっても、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を得ることができる。

L-アミノ酸アナログ耐性変異株は、例えば、変異処理したメチロフィラス属細菌を種々の濃度のL-アミノ酸アナログを含有する寒天培地に接種し、コロニーを形成する菌株を選択することにより、取得することができる。

また、栄養要求性変異株は、メチロフィラス属細菌のコロニーを目的の栄養物質を含む寒天培地に形成させ、これを前記栄養物質を含まない寒天培地にレプリカし、同栄養物質を含まない寒天培地で生育できない菌株を選択することにより、取得することができる。

次に、L-アミノ酸生合成系酵素遺伝子の増強によってL-アミノ酸生産能を付与又は増強する方法を、以下に例示する。

【0022】

〔L-リジン〕

L-リジン生産能は、例えば、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強することによって付与することができる。

メチロフィラス属細菌のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性を増強するには、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子断片及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子断片を、メチロフィラス属細菌で機能するベクター、好ましくはマルチコピー型ベクターと連結して組み換えDNAを作製し、これをメチロフィラス属細菌の宿主に導入して形質転換すればよい。形質転換株の細胞内のジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードする遺伝子及びアスパルトキナーゼをコードする遺伝子のコピー数が上昇する結果、これらの酵素の活性が増強される。以下、ジヒドロジピコリン酸合成酵素をDDPS、アスパルトキナーゼをAK、アスパルトキナーゼIIIをAKIIIと略すことがある。

【0023】

DDPSをコードする遺伝子及びAKをコードする遺伝子の供与微生物としては、メチロフィラス属に属する微生物中でDDPS活性及びAK活性を発現することができる微生物であれば、いかなる微生物でも使用できる。微生物は、野生株及びそれから誘導した変異株のいずれでもよい。具体的にはE. coli (エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*)) K-12株及びメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIM B10515) 等が挙げられる。エシェリヒア属細菌由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapA, Richaud, F. et al. J. Bacteriol., 297 (1986)) 及びAKIIIをコードする遺伝子 (lysC, Cassan, M., Parsot, C., Cohen, G.N. and Patte, J.C., J. Biol. Chem., 261, 1052 (1986)) は、いずれも塩基配列が明らかにされているので、これらの遺伝子の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、E. coli K-12等の微生物の染色体DNAを鋳型とするPCR法により、これらの遺伝子を取得することが可能である。以下、E. coli由来のdapA及びlysCを例として説明するが、本発明に用いる遺伝子は、これらに限定されるものではない。

【0024】

本発明に用いるDDPS及びAKは、L-リジンによるフィードバック阻害を受けないものであることが好ましい。E. coli由来の野生型DDPSはL-リジンによるフィードバック阻害を受けることが知られており、E. coli由来の野生型AKIIIはL-リジンによる抑制及びフィードバック阻害を受けることが知られている。したがって、メチロフィラス属細菌に導入するdapA及びlysCは、それぞれL-リジン

によるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPS及びAKIIIをコードするものであることが好ましい。以下、*L*-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有するDDPSを「変異型DDPS」、変異型DDPSをコードするDNAを「変異型dapA」と呼ぶことがある。また、*L*-リジンによるフィードバック阻害が解除される変異を有する*E. coli*由来のAKIIIを「変異型AKIII」、変異型AKIIIをコードするDNAを「変異型lysC」と呼ぶことがある。

尚、本発明においては、DDPS及びAKは必ずしも変異型である必要はない。例えば、 *Corynebacterium* 属細菌由来のDDPSはもともと *L*-リジンによるフィードバック阻害を受けないことが知られている。

【0025】

E. coli 由来の野生型dapAの塩基配列を配列番号1に、同塩基配列によってコードされる野生型DDPSのアミノ酸配列を配列番号2に例示する。また、*E. coli* 由来の野生型lysCの塩基配列を配列番号3に、同塩基配列によってコードされる野生型AKIIIのアミノ酸配列を配列番号4に例示する。

L-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型DDPSをコードするDNAとしては、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有するDDPSをコードするDNAが挙げられる。また、*L*-リジンによるフィードバック阻害を受けない変異型AKIIIをコードするDNAとしては、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有するAKIIIをコードするDNAが挙げられる。

【0026】

遺伝子のクローニングに使用されるプラスミドとしては、*Escheria* 属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

【0027】

また、*Methylobacillus* 属細菌で機能するベクターとは、例えば *Methylobacillus* 属細菌で自律複製出来るプラスミドである。具体的には、広宿主域ベクターであるRSF1010及びその誘導体、例えばpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsygankov, Y.

D. Plasmid, 1986, 16, 161-167)、あるいはpMFY42 (gene, 44, 53(1990))、pRP301、pTB70 (Nature, 287, 396, (1980)) 等が挙げられる。

【0028】

dapA及びlysCとメチロフィラス属細菌で機能するベクターを連結して組み換えDNAを調製するには、dapA及びlysCを含むDNA断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4 DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。dapA及びlysCは、それぞれ別個のベクターに搭載してもよく、同一のベクターに搭載してもよい。

【0029】

変異型DDPSをコードする変異型dapA及び変異型AKIIIをコードする変異型lysCを含むプラスミドとして、広宿主域プラスミドRSFD80が知られている (W095/16042号)。同プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、同株は1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。RSFD80は、AJ12396株から、公知の方法によって取得することができる。

【0030】

RSFD80に含まれている変異型dapAは、配列番号1に示す野生型dapAの塩基配列において塩基番号597のCがTに変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型DDPSは、配列番号2に示すアミノ酸配列において118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された配列を有する。また、RSFD80に含まれている変異型lysCは、配列番号3に示す野生型lysCの塩基配列において塩基番号1638のCがT変化した配列を有し、それによって、コードされる変異型AKIIIは、配列番号4に示すアミノ酸配列において352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された配列を有する。

【0031】

上記のように調製した組換えDNAをメチロフィラス属細菌に導入するには、十分な形質転換効率が得られる方法ならば、いかなる方法を用いてもよいが、例えば、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 19

7(1997)) が挙げられる。

【0032】

DDPS活性及びAK活性の増強は、dapA及びlysCをメチロフィラス属細菌の染色体DNA上に多コピー存在させることによって達成できる。メチロフィラス属細菌の染色体DNA上にdapA及びlysCを多コピーで導入するには、染色体DNA上に多コピー存在する配列を標的に利用して相同組換えにより行う。染色体DNA上に多コピー存在する配列としては、レペッティブDNA、転移因子の端部に存在するインバーティッド・リピートが利用できる。あるいは、特開平2-109985号公報に開示されているように、dapA及び／又はlysCをトランスポゾンに搭載してこれを転移させて染色体DNA上に多コピー導入することも可能である。いずれの方法によっても形質転換株内のdapA及びlysCのコピー数が上昇する結果、DDPS活性及びAK活性が増幅される。

【0033】

DDPS活性及びAK活性の増幅は、上記の遺伝子増幅による以外に、dapA及びlysCのプロモーター等の発現調節配列を強力なものに置換することによっても達成される（特開平1-215280号公報参照）。たとえば、lacプロモーター、trpプロモーター、trcプロモーター、tacプロモーター、ラムダファージのP_Rプロモーター、P_Lプロモーター、tetプロモーター、amyEプロモーター、spacプロモーター等が強力なプロモーターとして知られている。これらのプロモーターへの置換により、dapA及びlysCの発現が強化されることによってDDPS活性及びAK活性が増幅される。発現調節配列の増強は、dapA及びlysCのコピー数を高めることと組み合わせてもよい。

【0034】

遺伝子断片とベクターを連結して組換えDNAを調製するには、遺伝子断片の末端に合うような制限酵素でベクターを切断する。連結は、T4DNAリガーゼ等のリガーゼを用いて行うのが普通である。DNAの切断、連結、その他、染色体DNAの調製、PCR、プラスミドDNAの調製、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E.

F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等に記載されている。

【0035】

DDPS及びAKの増強に加えて、他のL-リジン生合成に関与する酵素を増強してもよい。そのような酵素としては、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素、ジアミノピメリン酸デヒドロゲナーゼ（以上、W096/40934号参照）、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（特開昭60-87788号）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（特公平6-102028号）、ジアミノピメリン酸エピメラーゼ遺伝子、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素等のジアミノピメリン酸経路の酵素、あるいはホモアコニット酸ヒドラターゼ遺伝子等のアミノアジピン酸経路の酵素等が挙げられる。

メチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素、ジヒドロジピコリン酸合成酵素、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素については後述する。

【0036】

さらに、本発明の微生物は、L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-リジンの生合成経路から分岐してL-リジン以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、ホモセリンデヒドロゲナーゼがある（W0 95/23864参照）。

【0037】

上記のL-リジン生合成に関与する酵素の活性を増強する手法は、以下に示す他のアミノ酸についても同様に適用することができる。

【0038】

〔L-グルタミン酸〕

メチロフィラス属細菌へのL-グルタミン酸生産能は、例えば、グルタミン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭61-268185号）、グルタミンシンターゼ、グルタミン酸シンターゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ（特開昭62-166

890号、特開昭63-214189号)、アコニット酸ヒドラターゼ(特開昭62-294086号)、クエン酸シンターゼ(特開昭62-201585号、特開昭63-119688号)、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ(特開昭60-87788号、特開昭62-55089号)、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ホスホエノールピルビン酸シンターゼ、エノラーゼ、ホスホグリセロムターゼ、ホスホグリセリン酸キナーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、フルトースビスリン酸アルドラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ(特開昭63-102692号)、グルコースリン酸イソメラーゼ、グルタミン-オキシグルタル酸アミノトランスフェラーゼ(WO99/07853)等の酵素をコードするDNAを導入することによって、付与することができる。

【0039】

さらに、本発明の微生物は、L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素の活性が低下または欠損していてもよい。L-グルタミン酸の生合成経路から分岐してL-グルタミン酸以外の化合物を生成する反応を触媒する酵素としては、 α ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ(α KGDH)、イソクエン酸リアーゼ、リン酸アセチルトランスフェラーゼ、酢酸キナーゼ、アセトヒドロキシ酸シンターゼ、アセト乳酸シンターゼ、ギ酸アセチルトランスフェラーゼ、乳酸デヒドロゲナーゼ、グルタミン酸デカルボキシラーゼ、1-ピロリンデヒドロゲナーゼ等がある。

【0040】

〔L-スレオニン〕

L-スレオニン生産能は、例えば、スレオニンオペロンを含有した組換えプラスミド(特開昭55-131397号公報、特開昭59-31691号公報、特開昭56-15696号公報、および特表平3-501682号公報参照)でメチロフィラス属細菌を形質転換することにより、付与又は増強することができる。

また、L-スレオニンによるフィードバック阻害が解除されたアスパルトキナーゼをコードする遺伝子を有するスレオニンオペロン(特公平1-29559号

公報)、ホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(特開昭60-012995号)、又はホモセリンキナーゼ及びホモセリンデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子(特開昭61-195695号)を増強することによっても、生産性を付与又は増強することができる。

【0041】

さらに、アスパラギン酸によるフィードバック阻害を解除する変異を有する変異型ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼをコードするDNAを導入することによって、L-スレオニン生産能を向上させることができる。

【0042】

〔L-バリン〕

L-バリンの生産能の付与は、例えば、制御機構が実質的に解除されたL-バリン生合成系遺伝子をメチロフィラス属細菌に導入することによって行うことができる。また、エシェリヒア属に属する微生物が保持するL-バリン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。

【0043】

L-バリン生合成系遺伝子としては、例えばE. coliの*ilvGMEDA*オペロンが挙げられる。尚、*ilvA*遺伝子がコードするスレオニンデアミナーゼは、L-イソロイシン生合成系の律速段階であるL-スレオニンから2-ケト酪酸への脱アミノ化反応を触媒する。したがって、L-バリン合成系の反応を効率よく進行させるためには、スレオニンデアミナーゼ活性を発現しないオペロンを用いることが好ましい。このようなスレオニンデアミナーゼ活性を発現しない*ilvGMEDA*オペロンとしては、スレオニンデアミナーゼ活性を失うような変異が*ilvA*に導入された、又は*ilvA*が破壊された*ilvGMEDA*オペロン、あるいは*ilvA*が欠失した*ilvGMED*オペロンが挙げられる。

【0044】

また、*ilvGMEDA*オペロンは、L-バリン及び/又はL-イソロイシン及び/又はL-ロイシンによるオペロンの発現調節(アテニュエーション)を受けるので、生成するL-バリンによる発現抑制を解除するために、アテニュエーションに必要な領域が除去又は変異されていることが好ましい。

上記のような、スレオニンデアミナーゼ活性を発現せず、アテニュエーションが解除された *ilvGMEDA* オペロンは、野生型 *ilvGMEDA* オペロンを変異処理し、または遺伝子組換え技術を用いて改変することにより得られる（以上、WO96/06926 参照）。

【0045】

〔L-ロイシン〕

L-ロイシンの生産能の付与または増強は、例えば、上記 L-バリン生産に必要な性質に加えて、制御機構が実質的に解除された L-ロイシン生合成系遺伝子を *Escherichia* 属に属する微生物に導入することによって行われる。また、*Escherichia* 属に属する微生物が保持する L-ロイシン生合成系遺伝子の制御機構が実質的に解除されるような変異を導入してもよい。このような遺伝子として、例えば、L-ロイシンによる阻害が実質的に解除された *leuA* 遺伝子が挙げられる。

【0046】

〔L-イソロイシン〕

L-イソロイシンは、例えば、*E. coli* 由来の L-スレオニンによる阻害が実質的に解除された アスパルトキナーゼ I-ホモセリンデヒドロゲナーゼ I をコードする *thrA* 遺伝子を含む *thrABC* オペロンと、L-イソロイシンによる阻害が実質的に解除された スレオニンデアミナーゼをコードする *ilvA* 遺伝子を含みかつアテニュエーションに必要な領域が除去された *ilvGMEDA* オペロンとを導入することにより、L-イソロイシン生産性を付与することができる（特開平 8-47397 参照）。

【0047】

〔その他のアミノ酸〕

L-トリプトファン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-スレオニン及び L-イソロイシンは、*Methylophilas* 属細菌のホスホエノールピルビン酸の生産能を上昇させることによって、生合成が強化され得る（WO97/08333）。

【0048】

Ｌ－フェニルアラニン及びＬ－チロシンは、脱感作型コリスミン酸ムターゼ－プレフェン酸デヒドラターゼ（CM-PDT）遺伝子（特開平5-236947号、特開昭62-130693号公報参照）、脱感作型DS（3-デオキシ-D-アラビノヘプツロン酸-7-リン酸シンターゼ）遺伝子（特開平5-236947号、特開昭61-124375号公報参照）を増強することによって、生産性が向上する。

また、Ｌ－トリプトファンは、脱感作型アントラニル酸合成酵素をコードする遺伝子を含むトリプトファンオペロン（特開昭57-71397号、特開昭62-244382号、米国特許第4,371,614）を増強することによって、生産性が向上する。

【0049】

上記のようにして得られるＬ－アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該培養物中にＬ－アミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からＬ－アミノ酸を採取することにより、Ｌ－アミノ酸を製造することができる。

また、Ｌ－アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌を培地に培養し、該細菌の菌体中にＬ－アミノ酸を生産蓄積させることにより、メチロフィラス属細菌の野生株に比べてＬ－アミノ酸含量が増加したメチロフィラス属細菌菌体を製造することができる。

本発明で用いられる微生物は、通常メタノール資化性微生物の培養に用いられる方法で培養することができる。本発明で用いられる培地は、炭素源、窒素源、無機イオン及び必要に応じてその他の有機微量成分を含む培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。

【0050】

メタノールを主たる炭素源として用いると、Ｌ－アミノ酸を安価に製造することができる。メタノールは、主たる炭素源として用いる場合は、培地中に0.001～30%添加する。窒素源としては硫酸アンモニウムなどを培地に添加して用いる。これらの他に、通常、リン酸カリウム、リン酸ナトリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガンなどの微量成分が少量添加される。

【0051】

培養は、振とう培養又は通気攪拌培養などの好気条件下、pH5～9、温度20～45℃に保持して行われ、通常24～120時間で終了する。

培養物からのL-アミノ酸の採取は、通常イオン交換樹脂法、沈殿法、その他の公知の方法を組み合わせることにより実施できる。

また、メチロフィラス属細菌菌体の培地からの分離は、通常の微生物菌体の分離法によって分離することができる。

【0052】

<2>本発明の遺伝子

本発明のDNAは、メチロフィラス・メチロトロファス由来のアスパルトキナーゼ（以下「AK」ともいう）、アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素（以下「ASD」ともいう）、ジヒドロジピコリン酸合成酵素（以下「DDPS」ともいう）、ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ（以下「DDPR」ともいう）、及び、ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素（以下「DPDC」ともいう）の各々の酵素をコードする遺伝子である。

【0053】

本発明のDNAは、例えば、メチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子ライブラリーを用いて、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCを欠損した微生物の変異株を形質転換し、栄養要求性が回復したクローンを選択することによって取得することができる。

【0054】

メチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子ライブラリーは、例えば以下のよう to 作製することができる。まず、メチロフィラス・メチロトロファス野生株、例えばメチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）から全染色体DNAを、Saitoらの方法（Saito, H. and Miura, K. (1963) Biochem. Biophys. Acta 72, 619-629）等により調製し、適当な制限酵素、例えばSau3AI又はAluI等で部分分解して、種々の断片混合物を得る。切断反応時間等を調節して切断の程度を調節すれば、幅広い種類の制限酵素が使用できる。

【0055】

ついで、切断された染色体DNA断片を、大腸菌（エシェリヒア・コリ（Esche

richia coli)) 細胞内で自律複製可能なベクターDNAに連結し、組換えDNAを作製する。具体的には、染色体DNAの切断に用いた制限酵素と同一末端塩基配列を生じさせる制限酵素をベクターDNAに作用させてこれを完全消化し、切断開裂する。次いで、上記のようにして得た染色体DNA断片混合物と開裂切断されたベクターDNAを混合し、これにDNAリガーゼ、好ましくはT4DNAリガーゼを作用させて組換えDNAを得る。

【0056】

得られた組換えDNAを用いて、大腸菌、例えば大腸菌JM109株等を形質転換し、形質転換体の培養液から組換えDNAを調製することによって、遺伝子ライブラリー液が得られる。この形質転換は D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326, 1979) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 等により行うことができる。後記実施例では、エレクトロポレーション法を採用した。

【0057】

前記ベクターとしては、pUC19、pUC18、pUC118、pUC119、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218、pSTV28、pSTV29等が挙げられ、その他ファージベクターも使用することができる。例えば、pUC118、pUC119にはアンピシリン耐性遺伝子が、pSTV28及びpSTV29にはクロラムフェニコール耐性遺伝子が含まれているので、培地中にクロラムフェニコールを含有させることにより、ベクターあるいは組換えDNAを保持する形質転換体のみを生育させることができる。

【0058】

形質転換体を培養し、菌体から組換えDNAを回収する方法としては、アルカリSDS法等が挙げられる。

上記のようにして得られたメチロフィラス・メチロトロファスの遺伝子ライブラリー液を用いて、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCを欠損した微生物の変異株を形質転換し、栄養要求性が回復したクローンを選択する。

【0059】

AKを欠損した微生物の変異株としては、3種類のAKをコードする遺伝子 (thrA, metLM, lysC) を欠損したE. coli GT3が挙げられる。ASDを欠損した微生物の変異株としては、E. coli Hfr3000 U482 (CGSC 5081株)が挙げられる。DDPSを欠損した微生物の変異株としては、E. coli AT997 (CGSC 4547株)が挙げられる。DDPRを欠損した微生物の変異株としては、E. coli AT999 (CGSC 4549株)が挙げられる。DPDCを欠損した微生物の変異株としては、E. coli AT2453 (CGSC 4505株)が挙げられる。これらの変異株は、E. coli Genetic Stock Center (米国コネチカット州ニューヘブン (New Haven) 06511-7444、エール大学生物学部オズボーン記念研究所 (Yale University, Dept. Biology, Osborn Memorial Labs.)、P.O. Box 6666) から入手できる。

【0060】

上記変異株は、いずれもM9最少培地では生育できないが、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、これらの遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。したがって、最少培地で生育可能な形質転換株を選択し、同株から組換えDNAを回収すれば、各々の酵素をコードする遺伝子を含むDNA断片が得られる。また、E. coli AT999 (CGSC 4549株)は、L培地等の完全培地であっても、ジアミノピメリン酸を添加しない場合には生育が非常に遅いが、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPRをコードする遺伝子を保持する形質転換株は当該遺伝子が機能することにより、正常な生育が観察される。したがって、L培地で正常に生育する形質転換株を選択することによっても、DDPRをコードする遺伝子を保持する形質転換株が得られる。

得られた組換えDNAから挿入DNA断片を取り出し、塩基配列を決定すると、各々の酵素のアミノ酸配列及びそれらをコードする遺伝子の塩基配列が決定される。

【0061】

本発明のAKをコードする遺伝子 (以下「ask」ともいう) は、配列表配列番号6に示されるアミノ酸配列を有するAKをコードする。ask遺伝子として具体的には、配列番号5の塩基番号からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のask遺伝子は、配列番号6に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列

をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

【0062】

本発明のASDをコードする遺伝子（以下「asd」ともいう）は、配列表配列番号8に示されるアミノ酸配列を有するASDをコードする。asd遺伝子として具体的には、配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のasd遺伝子は、配列番号8に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

【0063】

本発明のDDPSをコードする遺伝子（以下「dapA」ともいう）は、配列表配列番号10に示されるアミノ酸配列を有するDDPSをコードする。dapA遺伝子として具体的には、配列番号9の塩基番号1268～2155から塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のdapA遺伝子は、配列番号10に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

【0064】

本発明のDDPRをコードする遺伝子（以下「dapB」ともいう）は、配列表配列番号12に示されるアミノ酸配列を有するDDPRをコードする。dapB遺伝子として具体的には、配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のdapB遺伝子は、配列番号12に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対するコドン等を他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

【0065】

本発明のDPDCをコードする遺伝子（以下「lysA」ともいう）は、配列表配列番号14に示されるアミノ酸配列を有するDPDCをコードする。lysA遺伝子として具体的には、配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列を有するDNAが挙げられる。また、本発明のlysA遺伝子は、配列番号14に示すアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列をコードする塩基配列であれば、各アミノ酸に対す

るコドン等を等価の他のコドンに置き換えた配列であってもよい。

【0066】

また、本発明の各酵素遺伝子は、各々配列番号6、8、10、12又は14に示すアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸残基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等の変異を含むアミノ酸配列からなるものであっても、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を有するタンパク質をコードするものであってもよい。ここで「複数」とは、好ましくは1～10個、より好ましくは1～5個、さらに好ましくは1～2個である。

【0067】

上記のようなAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0068】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCを保持する微生物の種や菌株の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

上記のような変異を有するDNAを、適当な細胞で発現させ、発現産物のAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を調べることにより、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。また、変異を有するAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列番号5の塩基番号510～1736からなる塩基配列、配列番号7の塩基番号98～1207からなる塩基配列、配列番号9の塩基番号12

68～2155からなる塩基配列、配列番号11の塩基番号2080～2883からなる塩基配列、配列番号13の塩基番号751～1995からなる塩基配列、又はこれらの塩基配列の一部を有するプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0069】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件は、プローブの塩基配列や長さによって異なるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば40%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1% SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1% SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。

【0070】

プローブとして、各遺伝子の一部の配列を用いることもできる。そのようなプローブは、各遺伝子の塩基配列に基づいて作製したオリゴヌクレオチドをプライマーとし、各遺伝子を含むDNA断片を鋳型とするPCR (polymerase chain reaction) 反応によって作製することができる。プローブとして、300bp程度の長さのDNA断片を用いる場合には、ハイブリダイゼーションの洗いの条件は、50℃、2×SSC、0.1% SDSが挙げられる。

上記のような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の活性発現ベクターにつなぎ、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC活性を測定することによって容易に取り除くことができる。

本発明により、メチロフィラス・メチロトロファス由来のAK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDC及びそれらをコードする遺伝子の塩基配列が明らかにされたので、これらの配列を基に作製したオリゴヌクレオチドプローブを用いたハイブリダイゼ

ーションにより、メチロフィラス・メチロトロファス遺伝子ライブラリーから、AK、ASD、DDPS、DDPR又はDPDCをコードするDNA配列を得ることができる。また、これらの酵素をコードするDNA配列は、上記ヌクレオチド配列を基に作製したオリグヌクレオチドプライマーを用い、PCR法によりメチロフィラス・メチロトロファス染色体DNAから増幅することによっても得られる。

上記遺伝子は、メチロフィラス属細菌のL-リジン生産性を増強するのに好適に利用することができる。

【0071】

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。

試薬は特に指定しない限り和光純薬、あるいはナカライテスク社製のものを用いた。各実施例で用いる培地の組成は以下に示すとおりである。いずれの培地もpHはNaOHあるいはHClで調製した。

【0072】

(L培地)

バクトトリプトン (ディフコ社製)	10g/L
酵母エキス (ディフコ社製)	5g/L
NaCl	5g/L

[120℃、20分間の蒸気滅菌を行った。]

【0073】

(L寒天培地)

L培地、

バクトアガー (ディフコ社製)	15g/L
-----------------	-------

[120℃、20分間の蒸気滅菌を行った。]

【0074】

(SOC培地)

バクトトリプトン (ディフコ社製)	20g/L
酵母エキス (ディフコ社製)	5g/L、
10mM NaCl	

2.5mM KCl

10mM MgSO_4 10mM MgCl_2

20mM グルコース

[マグネシウム溶液及びグルコースを除いて、蒸気滅菌した(120℃、20分間)後、予め0.22 μm のフィルターを通した2Mのマグネシウム保存液(1M MgSO_4 、1M MgCl_2)並びに2Mグルコース溶液を加え、再び0.22 μm のフィルターを通した。]

【0075】

(121M1培地)

 K_2HPO_4 1.2g/L KH_2PO_4 0.62g/L

NaCl 0.1g/L

 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.05g/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.0mg/L H_3BO_3 10 $\mu\text{g/L}$ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 5 $\mu\text{g/L}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10 $\mu\text{g/L}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 70 $\mu\text{g/L}$ $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10 $\mu\text{g/L}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 5 $\mu\text{g/L}$

メタノール 1%(vol/vol) pH 7.0

[メタノール以外は121℃、15分間の蒸気滅菌を行った。良く冷めてからメタノールを添加した。]

【0076】

(121生産培地の組成)

メタノール 2%

リン酸二カリウム 0.12%

リン酸一カリウム	0.062%
塩化カルシウム六水塩	0.005%
硫酸マグネシウム	0.02%
塩化ナトリウム	0.01%
塩化第三鉄	1.0mg/L
硫酸アンモニウム	0.3%
硫酸銅 5 水塩	5 μg/L
硫酸マンガン 5 水塩	10 μg/L
モリブデンナトリウム 2 水塩	10 μg/L
ホウ酸	10 μ/L
硫酸亜鉛	70 μg/L
塩化コバルト	5 μg/L、
炭酸カルシウム（関東化学製）	3%

(pH7.0)

【 0 0 7 7 】

(121M1寒天培地)

121M1培地

バクトアガー（ディフコ社製）15g/L

[メタノール以外は121℃、15分間の蒸気滅菌を行った。良く冷めてからメタノールを添加した。]

【 0 0 7 8 】

(M 9 最少培地)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	80g/L
KH_2PO_4	15g/L
NaCl	2.5g/L
NH_4Cl	5g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.48mg/L
グルコース	5g/L

pH7.0

[MgSO₄、およびグルコースは別に殺菌(120℃、20分間)して加えた。また、必要に応じて適量のアミノ酸およびビタミンを添加した。]

【0079】

(M9 最少寒天培地)

M9 最少培地

バクトアガー (ディフコ社製) 15g/L

【0080】

【実施例1】 L-リジン生産菌の創製 (1)

<1>メチロフィラス属細菌への変異型lysC及び変異型dapAの導入

変異型lysC及び変異型dapAは、これらを含む公知のプラスミドRSFD80 (W095/16042号参照) を用いてメチロフィラス属細菌に導入した。RSFD80は、RSF1010の誘導体である広宿主域ベクタープラスミドpAYC32 (Chistorerdov, A.Y., Tsyganov, Y.D. Plasmid, 1986, 16, 161-167) に由来するプラスミドpVIC40 (W090/04636国際公開パンフレット、特表平3-501682号公報) のテトラサイクリン耐性遺伝子のプロモーター (tetP) の下流に、tetPに対して転写方向が正方向となるようにE. coli由来の変異型dapA及び変異型lysCがこの順序で配置されている。この変異型dapAは、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDP Sをコードしている。また、前記変異型lysCは、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換された変異型AKIIIをコードしている。

【0081】

RSFD80は、以下に示すようにして構築された。プラスミドpdapAS24上にある変異型dapAをpVIC40のテトラサイクリン耐性遺伝子プロモーターの下流に連結し、図1に示す様にしてRSF24Pを得た。次に、このRSF24Pと、変異型lysCを含むpLLC^{*80}から、変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80を図2の様に作製した。すなわち、pVIC40はスレオニンオペロンを含んでいるが、RSFD80ではこのスレオニンオペロンが変異型dapAを含むDNA断片及び変異型lysCを含むDNA断片と置換されている。

【0082】

RSFD80プラスミドで形質転換されたE. coli JM109株は、AJ12396と命名され、

同株は、1993年10月28日に通産省工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 FERM P-13936として寄託され、1994年11月1日にブダペスト条約に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4859の受託番号のもとで寄託されている。

【0083】

E. coli AJ1239株を、ストレプトマイシンを20mg/L含む30mlのLB培地で30℃で12時間培養して得た菌体から、Wizard^R Plus Midipreps DNA Purification System (プロメガ社より市販)を用いてRSFD80プラスミドを精製した。

【0084】

上記のようにして得られたRSFD80プラスミドを、エレクトロポレーション法 (Canadian Journal of Microbiology, 43, 197(1997)) によりメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) に導入した。なお、対照として、RSFD80プラスミドを作製する際に用いたpVIC40プラスミドよりスレオニンオペロンをコードするDNA領域を削除してベクター部分のみを持つpRSプラスミド (特表平3-501682号公報参照) を、RSFD80と同様にしてAS1株に導入した。

【0085】

<2>E. coli由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌のAKIII活性

RSFD80プラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (以下、「AS1/RSFD80」と略すことがある) と、pRSプラスミドを保持するメチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (以下、「AS1/pRS」と略すことがある) より、無細胞抽出液を調製し、AK活性を測定した。無細胞抽出液 (粗酵素液) は次のようにして調製した。AS1/RSFD80およびAS1/pRS株を、ストレプトマイシン20mg/Lを含む下記組成の121M1培地に植菌し、37℃で34時間振とう培養し、集菌した。培地のpHは水酸化ナトリウム水溶液または塩酸で調整した。培地は各成分を溶解した後120℃15分間の蒸気滅菌を行った。メタノールは、メンブレンフィルター (ミリポア社製、0.45μm) で除菌した後、蒸気滅菌した培地に添加し、炭酸カルシウム (関東化学製) は別に180℃で48時間乾熱滅菌したものを蒸気滅菌した培地に添加した。

【0086】

上記のようにして得られた菌体を、0℃の条件下で0.2% KClで洗浄し、10mM MgSO_4 , 0.8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ および0.03M β -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7) に懸濁し、超音波処理 (0℃、200W、10分) で菌体を破碎した。菌体破碎液を0℃の条件下で、3,300rpmで30分間遠心し、上清をとってこれに80%飽和になるように硫酸アンモニウムを添加し、0℃で1時間放置した後遠心し、ペレットを10mM MgSO_4 , 0.8M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ および0.03M β -メルカプトエタノールを含む20mMリン酸カリウム緩衝液 (pH7) に溶解した。

【0087】

AK活性の測定はスタットマンらの方法 (Stadtman, E. R., Cohen, G. N., Le Bras, G., and Robichon-Szulmajster, H., J. Biol. Chem., 236, 2033(1961)) に従った。すなわち、下記組成の反応液を30℃で45分インキュベートし、 FeCl_3 溶液 (2.8N HCl: 0.4ml, 12%TCA: 0.4ml, 5% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ /0.1N HCl: 0.7ml) を加えて発色させ、これを遠心後、上清の540nmでの吸光度を測定した。活性は1分間に生成するヒドロキサム酸の量で表示 (1U=1mmol/分) した。モル吸光係数は600とした。なお、反応液からアスパラギン酸カリウムをのぞいたものをブランクとした。酵素活性を測定する際、酵素反応液中に種々の濃度のL-リジンを加え、L-リジンによる阻害の度合いを調べた。結果を表1に示した。

【0088】

(反応液組成)

reaction mixture ^{*1}	0.3ml
ヒドロキシルアミン溶液 ^{*2}	0.2ml
0.1Mアスパラギン酸カリウム (pH7.0)	0.2ml
酵素液	0.1ml
水 (バランス)	計 1ml

*1: 1M Tris-HCl (pH8.1) 9ml, 0.3M MgSO_4 0.5ml, 0.2M ATP (pH7.0) 5ml

*2: 8Mヒドロキシルアミン溶液を直前にKOHで中和したもの

【0089】

【表1】

表1

菌株	AK活性 (比活性 ^{*1})	L-リジン5mM存在 時の比活性	阻害解除度 ^{*2} (%)
AS1/pRS	7.93	9.07	114
AS1/RSFD80	13.36	15.33	115

*1: nmol/分/mgタンパク質

*2: L-リジン5mM存在時の活性保持率

【0090】

表1に示すように、RSFD80プラスミドの導入によりAK活性が約1.7倍に上昇した。また、RSFD80プラスミドにコードされるE. coli由来のAKはL-リジンにより阻害が完全に解除されていることが確認された。また、AS1株が元来保持するAKは、L-リジン単独では阻害を受けないことがわかった。尚、本発明者らは、AS1株由来のAKは、L-リジンとL-スレオニンが反応液中に各2mMづつ存在するときに、100%阻害されることを発見している（協奏阻害）。

【0091】

<3>E. coli由来の変異型lysC及び変異型dapAを保持するメチロフィラス属細菌によるL-リジンの製造

次に、AS1/RSFD80およびAS1/pRS株をストレプトマイシン20mg/Lを含む121生産培地に植菌し、37℃で34時間振とう培養した。培養終了後、菌体を遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表2に示す。

【0092】

【表2】

表2

菌株	L-リジン塩酸塩の生産量 (g/L)
----	-----------------------

AS1/pRS	0
AS1/RSFD80	0.3

【0093】

【実施例2】L-リジン生産菌の創製(2)

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株(NCIMB10515)を121M1培地で37℃、15時間培養した。得られた菌体を常法によりNTG処理(NTG濃度100mg/L、37℃、5分)し、S-(2-アミノエチル)-システイン(AEC)7g/L、及びL-スレオニン3g/Lを含有する121M1寒天培地に塗布した。これを、37℃で2～8日間培養し、生じたコロニーを釣菌分離して、AEC耐性株を取得した。

【0094】

上記のAEC耐性株を、121生産培地に植菌し、好氣的に37℃で38時間培養した。培養終了後、培地から菌体、炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-リジン濃度をアミノ酸分析計(日本分光製、高速液体クロマトグラフィー)で定量した。親株よりL-リジン生産能が向上した株を選択し、メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株と命名した。親株(AS1株)及びAR-166株のL-リジン生産量を表3に示す。

【0095】

【表3】

表3

菌株	L-リジン塩酸塩の生産量 (mg/L)
AS1	5.8
AR-166	80

【0096】

メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株は、プライベートナンバーAJ13608が付与され、1999年6月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17416として寄託されている。

【0097】

【実施例3】分岐鎖アミノ酸生産菌の創製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株（NCIMB10515）を121M1培地で37℃、15時間培養した。得られた菌体を常法によりNTG処理（NTG濃度100mg/L、37℃、5分）し、カザミノ酸（DIFCO社製）0.5%を含有する121M1寒天培地に塗布した。これを37℃で2～8日間培養し、コロニーを形成させた。これらのコロニーを釣菌分離して、121M1寒天培地及びカザミノ酸0.5%を含有する121M1寒天培地に植菌し、前者に比べて後者で生育がよい株を選択し、これをカザミノ酸要求株とした。こうして、500株のNTG処理株から9株のリーキーなカザミノ酸要求株を得た。これらのカザミノ酸要求株から、L-バリン、L-ロイシン及びL-イソロイシンを親株よりも多く培地中に蓄積する株を1株得た。これをメチロフィラス・メチロトロファスC138株と命名した。

メチロフィラス・メチロトロファスAR-166株は、プライベートナンバーAJ13609が付与され、1999年6月10日に通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所（郵便番号305-8566日本国茨城県つくば市東一丁目1番3号）に受託番号FERM P-17417として寄託されている。

【0098】

親株（AS1株）及びC138株を、30g/Lの炭酸カルシウム（関東化学製）を含む121生産培地に植菌し、好氣的に37℃で34時間培養した。培養終了後、培地から菌体、炭酸カルシウムを遠心分離により除去し、培養上清に含まれるL-バリン、L-ロイシン及びL-イソロイシンの濃度をアミノ酸分析計（日本分光製、高速液体クロマトグラフィー）で定量した。結果を表4に示す。

【0099】

【表4】

表4

菌株	L-バリン (mg/L)	L-ロイシン (mg/L)	L-イソロイシン (mg/L)
AS1	7.5	5.0	2.7
C138	330	166	249

【0100】

【実施例4】メチロフィラス・メチロトロファスAS1株の染色体DNAライブラリーの作製

(1) メチロフィラス・メチロトロファスAS1株からの染色体DNAの調製

メチロフィラス・メチロトロファスAS1株 (NCIMB10515) を試験管内5mlの121M1培地に一白金耳植菌し、37℃一晩振盪培養した。得られた培養液を500ml容坂口フラスコ内の50mlの121M1培地に1%となるように摂取し、37℃にて一晩振盪培養した後、遠心分離にて集菌した。50mlのTEN溶液 (50mM Tris-HCl (pH8.0), 10mM EDTA及び20mM NaClからなる溶液 (pH8.0)) に懸濁し、遠心分離して集菌後、5mg/mlのリゾチームおよび10μg/mlのリボヌクレアーゼAを含む5mlのTEN溶液に再懸濁した。37℃で、30分間保温後、プロテイナーゼKおよびラウリル硫酸ナトリウムを終濃度が各々10μg/ml、0.5%(wt/vol)となるように添加した。

【0101】

70℃で2時間保温後、等量の飽和フェノール溶液 (10mM Tris-HCl (pH 8.0)で飽和したフェノール溶液) を加えて混合した後、遠心分離して上清を回収し、等量のフェノール・クロロホルム溶液 (フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1) を加えて混合し、遠心分離した。上清を回収後、等量のクロロホルム溶液 (クロロホルム：イソアミルアルコール=24：1) を加えて同様の抽出操作を繰り返した。上清に1/10量の3M酢酸ナトリウム (pH4.8) と2.5容のエタノールを加えて染色体DNAを沈殿させた。沈殿を遠心分離して回収後、70%のエタノールで洗浄し、真空乾燥させ、TE溶液 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA (pH 8.0)) 適量に溶解した。

【0102】

(2) 遺伝子ライブラリーの調製

(1) で得られた染色体DNA ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$) $50\mu\text{l}$ 、H緩衝液 (500mM Tris-HCl, 100mM MgCl_2 , 10mM dithiothreitol, 1000mM NaCl (pH7.5)) $20\mu\text{l}$ 、制限酵素Sau3AI (宝酒造製) 8単位を、全容 $200\mu\text{l}$ 中で 37°C 、10分間反応させた後、 $200\mu\text{l}$ のフェノール・クロロホルム溶液を加えて混合し、反応を停止させた。反応液を遠心分離した後上層を回収し、 0.8% アガロースゲルにて分離し、2~5キロベースペア (以下「kbp」と記載) に相当するDNAを、ConcertTM Rapid Gel Extraction System (DNA回収キット、GIBCO BRL社製) を用いて回収した。このようにして分画したサイズをもつDNAの溶液を $50\mu\text{l}$ 得た。

【0103】

一方、プラスミドpUC118 (宝酒造製) $2.5\mu\text{g}$ 、K緩衝液 (200mM Tris-HCl, 100mM MgCl_2 , 10mM dithiothreitol, 1000mM KCl (pH8.5)) $2\mu\text{l}$ 、制限酵素BamHI (宝酒造製) 10単位を、全容 $20\mu\text{l}$ 中で 37°C 、2時間反応させた後、子牛小腸アルカリフォスファターゼ (宝酒造製) 20単位を添加して、さらに30分間反応させた。等量のフェノール・クロロホルム溶液を加えて混合、遠心分離し、上清を回収後、等量のクロロホルム溶液を加えて同様の抽出操作を繰り返した。上清に1/10量の 3M 酢酸ナトリウム (pH4.8) と2.5容のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。このDNAを遠心分離して回収後、 70% のエタノールで洗浄し、真空乾燥させ、TE溶液に溶解した。

【0104】

以上のように調製した染色体DNAのSau3AI消化物と、pUC118のBamHI消化物を、Ligation Kit ver.2 (宝酒造製) を用いて連結させた。反応液に1/10量の 3M 酢酸ナトリウム (pH4.8) と2.5容のエタノールを加えてDNAを沈殿させた。これを遠心分離して回収後、 70% のエタノールで洗浄し、真空乾燥させ、TE溶液に溶解した (リガーゼ液A)。

【0105】

上記の操作と同様にして、染色体DNAを制限酵素AluI (宝酒造製) にて部分消化した断片とプラスミドpSTV29 (宝酒造製) をSmaI にて消化した断片を連結したもの

も調製した（リガーゼ液B）。

E. coli JM109を試験管内5mlのL培地に一白金耳植菌し、37℃一晩振盪培養した。得られた培養液を500ml容坂口フラスコ内の50mlのL培地に1%となるように接種し、37℃にて、 OD_{660} が0.5~0.6となるまで培養した後、15分間氷冷した。4℃で遠心分離して集菌した。菌体を50mlの氷冷した水に懸濁し、遠心分離して菌を洗浄した。この操作をもう一度繰り返した後、50mlの氷冷した10%グリセロール溶液に懸濁し、遠心分離して菌を洗浄した。菌体と同じ容量の10%グリセロール溶液に懸濁して50 μ lずつ分注した。各50 μ l容量分の細胞に対して、上記で調製したリガーゼ液Aあるいはリガーゼ液Bをそれぞれ1 μ l加え、BioRad社製のエレクトロポレーション装置専用（0.1cm幅）のキュベット（予め氷冷）に混合液を移した。

【0106】

装置の設定を1.8kV、25 μ F、パルスコントローラーの設定を200 Ω にした。キュベットを装置にセットし、パルスを印加した。印加後、直ちに氷冷したSOC培地1mlを加え、滅菌した試験管に移し、37℃で1時間振盪培養した。抗生物質を含むL寒天培地（リガーゼ液Aを用いた場合は100 μ g/mlのアンプシリン、リガーゼ液Bを用いた場合は20 μ g/mlクロラムフェニコール）にそれぞれの菌体培養液を塗布し、37℃で一晩保温した。各寒天培地上に出現したコロニーを各々掻き集め、500ml容坂口フラスコ内の、各々の抗生物質を含むL培地50mlに各々摂取し、37℃、2時間振盪培養した。アルカリSDS法にて各々の培養液からプラスミドDNAを抽出し、それぞれ遺伝子ライブラリー液Aおよび遺伝子ライブラリー液Bとした。

【0107】

【実施例5】メチロフィラス・メチロトロファスAS1株のリジン生合成遺伝子のクローニング

（1）アスパルトキナーゼ（AK）をコードする遺伝子のクローニング

3つのAKをコードする遺伝子(*thrA*, *metLM*, *lysC*)を欠損した*E. coli* GT3を、上記と同じエレクトロポレーション法で、遺伝子ライブラリー液Bを用いて形質転換した。形質転換液に、20 μ g/mlのジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加

し、37℃にて振盪培養後、培養液を20 μ g/mlのジアミノピメリン酸及び20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地に塗布しコロニーを出現させた。これをマスタープレートとして、20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むM9寒天培地へのレプリカを行い、37℃にて2～3日間保温した。宿主はAK活性を有さないためにジアミノピメリン酸を含んでいないM9最少培地において生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のAKをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

【0108】

約3000個の形質転換体から2個がM9培地にコロニーを形成した。M9培地で出現したコロニーよりプラスミドを抽出し、解析を行ったところ、プラスミド上に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMASK-1、pMMASK-2と命名した。これらのプラスミドを用いて、再度E. coli GT3を形質転換したところ、形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらにこれらのプラスミドを各々含む形質転換体を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離して集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Miyajimaらの方法 (Journal of Biochemistry (Tokyo), vol.63, 139-148 (1968)) に従いAK活性を測定した(図3)。なお、ベクターpSTV29を保持するGT3株を、20 μ g/mlのジアミノピメリン酸及び20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて同様に培養し、AK活性を測定した。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体に比べて、挿入断片を有する2つのクローンには有意にAK活性の増加が認められたので、pSTV29上にクローニングできた遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のAKをコードする遺伝子であることが判明した。この遺伝子をaskと命名した。

【0109】

ask遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。pMMASK-1とpMMASK-2は共通の断片を含んでいることがわかった。このようにして得られたメチロフィラス・メチロトロファス由来ask遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号5に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号5及び6に示す。

【0110】

(2) アスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素 (ASD) をコードする遺伝子のクローニング

asd遺伝子を欠損した*E. coli* Hfr3000 U482 (CGSC 5081株)を、上記と同様にして、エレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Bを用いて形質転換した。形質転換液に、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、 37°C にて振盪培養後、遠心分離にて集菌した。菌体をL培地に懸濁後、遠心分離にて洗浄を行った。同様の洗浄操作をもう一度繰り返し、菌体をL培地に懸濁後、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むL寒天培地に塗布し、 37°C で一晩保温した。宿主はasd遺伝子を欠損しているために、ジアミノピメリン酸を含んでいないL培地では生育が非常に遅い。これに対してメチロフィラス・メチロトロファス由来のASDをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりL培地においても正常な生育が観察されると予想される。さらにM9最少培地において、宿主*E. coli*は生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のASDをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。そこでL培地で正常に生育してきた形質転換体のコロニーを釣上げ、これをM9寒天培地に画線培養したところ生育が認められ、予想どおりこれら形質転換株においてASDをコードする遺伝子が機能していることを確認した。

【0111】

M9培地で出現した形質転換体3株よりプラスミドを抽出し、それらプラスミドの中に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMASD-1、pMMASD-2、pMMASD-3と命名した。これらのプラスミドを用いて再度*E. coli* Hfr3000 U482を形質転換したところ、各形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらに各形質転換体を $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むL培地にて一晩培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて粗酵素液を調製し、Boyらの方法 (Journal of Bacteriology, vol.112(1), 84-92(1972)) に準じてASD活性を測定した (図4)。なお、コントロール実験についてはベクターを保持する宿主を、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸及び $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むL培地にて同様に培養しASD活性を測定した。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体に

は酵素活性を検出できなかったのに対して、挿入断片を有する3つのクローンにはASD活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のASDをコードする遺伝子 (asdと命名) であることが判明した。

【0112】

asd遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。そして得られた3つのクローンは全て共通の断片を含んでいることがわかった。メチロフィラス・メチロトロファス由来asd遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号7に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号7及び8に示す。

【0113】

(3) ジヒドロジピコリン酸合成酵素 (DDPS) をコードする遺伝子のクローニング

dapA遺伝子を欠損したE. coli AT997 (CGSC 4547株) を、上記と同じエレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Aを用いて形質転換した。形質転換液に、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、 37°C にて振盪培養後、培養液を $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸及び $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL培地に塗布しコロニーを出現させた。これをマスタープレートとして $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むM9最少寒天培地に培養液を塗布し 37°C にて2~3日間保温した。宿主はdapA遺伝子を欠損しているために、ジアミノピメリン酸を含んでいないM9最少培地において生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPSをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

【0114】

M9培地で出現したコロニー2株よりプラスミドを抽出し調べたところ、プラスミド中に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMDAPA-1、pMMDAP-2と命名した。これらのプラスミドを用いてE. coli AT997をあらためて形質転換したところ、各形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらにこれらのプラスミドを含む形質転換体を $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL培地にて一夜培養し、培

養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Yugariらの方法 (Journal of Biological Chemistry, vol.240, p.4710(1965)) に従いDDPS活性を測定した (図5)。なお、コントロール実験についてはベクターを保持する宿主を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸及び100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL培地にて同様に培養し、DDPS活性を測定した。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性を検出できなかったのに対して、挿入断片を有するプラスミドをもつ各形質転換体にはDDPS活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPSをコードする遺伝子 (dapAと命名) であることが判明した。

【0115】

dapA遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。2つの挿入断片中には共通するDNA断片を含んでいることがわかった。メチロフィラス・メチロトロファス由来dapA遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号9に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号9及び10に示す。

【0116】

(4) ジヒドロジピコリン酸レダクターゼ (DDPR) をコードする遺伝子のクローニング

dapB遺伝子を欠損したE. coli AT999 (CGSC 4549株) を、上記と同じエレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Aを用いて形質転換した。形質転換液に、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸を含むSOC培地を添加し、37℃にて振盪培養後、遠心分離にて集菌した。菌体をL培地に懸濁後、遠心分離にて洗浄を行った。同様の洗浄操作をもう一度繰り返しL培地に懸濁後、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL寒天培地に培養液を塗布し、37℃一晩保温した。宿主はdapB遺伝子を欠損しているためにジアミノピメリン酸を含んでいないL培地では生育が非常に遅い。メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPRをコードする遺伝子をもつプラスミドを保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりL培地においても正常な生育が観察される。さらにM9最少培地において宿主E. coliは生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPR遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能とな

る。

【0117】

L培地で正常に生育してきた形質転換体をM9寒天培地に画線培養したところ、M9培地上でも生育してきた。こうしてこのDDPRをコードする遺伝子が機能していることを確認した。M9培地で出現したコロニーよりプラスミドを抽出し調べたところ、プラスミド中に挿入断片の存在を確認した。当該プラスミド(pMMDAPB)を用いて、再度E. coli AT999を形質転換したところ、当該形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらに当該プラスミドを含む形質転換体をL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Tamuraらの方法(Journal of Biological Chemistry, vol.249, p.3034(1974))に従いDDPR活性を測定した(図6)。なお、コントロール実験については、ベクターを保持する宿主を20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のジアミノピメリン酸及び100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含むL培地にて同様に培養し、DDPR活性を測定した。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性は検出できなかったのに対して、pMMDAPBを有する形質転換体にはDDPR活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のDDPRをコードする遺伝子(dapBと命名)であることが判明した。

【0118】

dapB遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。メチロフィラス・メチロトロファス由来dapB遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号11に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号11及び12に示す。

【0119】

(5) ジアミノピメリン酸脱炭酸酵素(DPDC)をコードする遺伝子のクローニング
lysA遺伝子を欠損したE. coli AT2453(CGSC 4505株)を、上記と同じエレクトロポレーション法で遺伝子ライブラリー液Aを用いて形質転換した。形質転換液にSOC培地を添加し、37℃にて振盪培養後、遠心分離し、菌体を5mlの滅菌水に懸濁しさらに遠心分離し洗浄した。この洗浄操作をもう一度繰り返し、菌体を500 μl の滅菌水に懸濁し、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むM9最少寒天培地

に培養液を塗布し、37℃にて2～3日間保温した。宿主はlysA遺伝子を欠損しているためにリジンを含んでいないM9最少培地において生育できないのに対し、メチロフィラス・メチロトロファス由来のDPDCをコードする遺伝子を保持する形質転換株は、当該遺伝子が機能することによりM9最少培地で生育可能となる。

【0120】

M9培地で出現した形質転換体3株よりプラスミドを抽出し調べたところ、プラスミド中に挿入断片の存在を確認した。各々のプラスミドをpMMLYSA-1、pMMLYSA-2、pMMLYSA-3と命名した。これらのプラスミドを用いてE. coli AT2453をあらためて形質転換したところ、各プラスミドの形質転換体はM9最少培地にて生育した。さらに各当該プラスミドを含む形質転換体を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて一夜培養し、培養液を遠心分離にて集菌後、超音波破碎にて細胞抽出液を調製し、Cremerらの方法 (Journal of General Microbiology, vol. 134, 3221-3229(1988)) に従いDPDC活性を測定した (図7)。なお、コントロール実験については、ベクターを保持する宿主を20 μ g/mlのクロラムフェニコールを含むL培地にて同様に培養しDPDC活性を測定した。その結果、ベクターのみを保持する形質転換体には酵素活性は検出できなかったのに対して、挿入断片を有するプラスミドを保持する形質転換体3株からはいずれもDPDC活性を検出することができたので、取得した遺伝子はメチロフィラス・メチロトロファス由来のDPDCをコードする遺伝子 (lysAと命名) であることが判明した。

【0121】

lysA遺伝子のDNA塩基配列はダイデオキシ法にて決定した。3つの挿入断片は全て共通のDNA断片を含んでいることがわかった。メチロフィラス・メチロトロファス由来lysA遺伝子を含むDNA断片の塩基配列を、配列番号13に示した。また、同塩基配列がコードし得るアミノ酸配列を、配列番号13及び14に示す。

【0122】

【発明の効果】

本発明により、L-アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌、同細菌を用いたL-アミノ酸の製造法、及びL-アミノ酸含量が増加したメチロフィラス

属細菌菌体が提供される。本発明の方法によれば、メタノールを原料としてL-アミノ酸を製造することが可能となる。また、本発明により、メチロフィラス属細菌の新規なL-リジン生合成酵素遺伝子が提供される。

【0123】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (Ajinomoto Co., Inc.)

<120> L-アミノ酸生産菌及びL-アミノ酸の製造法

<130> P-6958

<141> 1999-12-24

<150> JP 11-103143

<151> 1999-04-09

<150> JP 11-169447

<151> 1999-06-16

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.0

【0124】

<210> 1

<211> 1197

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (272)..(1147)

<400> 1

ccaggcgact gtcttcaata ttacagccgc aactactgac atgacgggtg atggtgttca 60
 caattccacg gcgatcggca cccaacgcag tgatcaccag ataatgtgtt gcgatgacag 120
 tgtcaaactg gttattcctt taaggggtga gttgttctta aggaaagcat aaaaaaaca 180
 tgcatacaac aatcagaacg gttctgtctg cttgctttta atgccatacc aaacgtacca 240
 ttgagacact tgtttgcaca gaggatggcc c atg ttc acg gga agt att gtc 292

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val

1

5

gcg att gtt act ccg atg gat gaa aaa ggt aat gtc tgt cgg gct agc 340

Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser

10

15

20

ttg aaa aaa ctg att gat tat cat gtc gcc agc ggt act tcg gcg atc 388

Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile

25

30

35

gtt tct gtt ggc acc act ggc gag tcc gct acc tta aat cat gac gaa 436

Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser Ala Thr Leu Asn His Asp Glu

40

45

50

55

cat gct gat gtg gtg atg atg acg ctg gat ctg gct gat ggg cgc att 484

His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile

60

65

70

ccg gta att gcc ggg acc ggc gct aac gct act gcg gaa gcc att agc 532

Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser

75

80

85

ctg acg cag cgc ttc aat gac agt ggt atc gtc ggc tgc ctg acg gta 580

Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly Ile Val Gly Cys Leu Thr Val

90	95	100	
acc cct tac tac aat cgt ccg tcg caa gaa ggt ttg tat cag cat ttc	628		
Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe			
105	110	115	
aaa gcc atc gct gag cat act gac ctg ccg caa att ctg tat aat gtg	676		
Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val			
120	125	130	135
ccg tcc cgt act ggc tgc gat ctg ctc ccg gaa acg gtg ggc cgt ctg	724		
Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu			
140	145	150	
gcg aaa gta aaa aat att atc gga atc aaa gag gca aca ggg aac tta	772		
Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu			
155	160	165	
acg cgt gta aac cag atc aaa gag ctg gtt tca gat gat ttt gtt ctg	820		
Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu Val Ser Asp Asp Phe Val Leu			
170	175	180	
ctg agc ggc gat gat gcg agc gcg ctg gac ttc atg caa ttg ggc ggt	868		
Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly			
185	190	195	
cat ggg gtt att tcc gtt acg act aac gtc gca gcg cgt gat atg gcc	916		
His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn Val Ala Ala Arg Asp Met Ala			
200	205	210	215
cag atg tgc aaa ctg gca gca gaa gaa cat ttt gcc gag gca cgc gtt	964		
Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu His Phe Ala Glu Ala Arg Val			
220	225	230	
att aat cag cgt ctg atg cca tta cac aac aaa cta ttt gtc gaa ccc	1012		
Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro			
235	240	245	
aat cca atc ccg gtg aaa tgg gca tgt aag gaa ctg ggt ctt gtg gcg	1060		

Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala
 250 255 260
 acc gat acg ctg cgc ctg cca atg aca cca atc acc gac agt ggt cgt 1108
 Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg
 265 270 275
 gag acg gtc aga gcg gcg ctt aag cat gcc ggt ttg ctg taaagtttag 1157
 Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His Ala Gly Leu Leu
 280 285 290
 ggagatttga tggcttactc tgttcaaaag tcgcgcctgg 1197

【 0 1 2 5 】

<210> 2

<211> 292

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 2

Met Phe Thr Gly Ser Ile Val Ala Ile Val Thr Pro Met Asp Glu Lys
 1 5 10 15
 Gly Asn Val Cys Arg Ala Ser Leu Lys Lys Leu Ile Asp Tyr His Val
 20 25 30
 Ala Ser Gly Thr Ser Ala Ile Val Ser Val Gly Thr Thr Gly Glu Ser
 35 40 45
 Ala Thr Leu Asn His Asp Glu His Ala Asp Val Val Met Met Thr Leu
 50 55 60
 Asp Leu Ala Asp Gly Arg Ile Pro Val Ile Ala Gly Thr Gly Ala Asn
 65 70 75 80
 Ala Thr Ala Glu Ala Ile Ser Leu Thr Gln Arg Phe Asn Asp Ser Gly
 85 90 95
 Ile Val Gly Cys Leu Thr Val Thr Pro Tyr Tyr Asn Arg Pro Ser Gln

100	105	110	
Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Ile Ala Glu His Thr Asp Leu			
115	120	125	
Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Ser Arg Thr Gly Cys Asp Leu Leu			
130	135	140	
Pro Glu Thr Val Gly Arg Leu Ala Lys Val Lys Asn Ile Ile Gly Ile			
145	150	155	160
Lys Glu Ala Thr Gly Asn Leu Thr Arg Val Asn Gln Ile Lys Glu Leu			
165	170	175	
Val Ser Asp Asp Phe Val Leu Leu Ser Gly Asp Asp Ala Ser Ala Leu			
180	185	190	
Asp Phe Met Gln Leu Gly Gly His Gly Val Ile Ser Val Thr Thr Asn			
195	200	205	
Val Ala Ala Arg Asp Met Ala Gln Met Cys Lys Leu Ala Ala Glu Glu			
210	215	220	
His Phe Ala Glu Ala Arg Val Ile Asn Gln Arg Leu Met Pro Leu His			
225	230	235	240
Asn Lys Leu Phe Val Glu Pro Asn Pro Ile Pro Val Lys Trp Ala Cys			
245	250	255	
Lys Glu Leu Gly Leu Val Ala Thr Asp Thr Leu Arg Leu Pro Met Thr			
260	265	270	
Pro Ile Thr Asp Ser Gly Arg Glu Thr Val Arg Ala Ala Leu Lys His			
275	280	285	
Ala Gly Leu Leu			

290

【0 1 2 6】

<210> 3

<211> 2147

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<220>

<221> CDS

<222> (584)..(1930)

<400> 3

tcgaagtgtt tctgtagtgc ctgccaggca gcggtctgcg ttggattgat gtttttcatt 60
 agcaatactc ttctgatttt gagaattgtg actttggaag attgtagcgc cagtcacaga 120
 aaaatgtgat ggtttttagtg ccgttagcgt aatgttgagt gtaaaccctt agcgcagtga 180
 agcatttatt agctgaacta ctgaccgcca ggagtggatg aaaaatccgc atgaccccat 240
 cgttgacaac cgccccgctc accctttatt tataaatgta ctacctgcgc tagcgcaggc 300
 cagaagaggc gcgttgccca agtaacgggtg ttggaggagc cagtcctgtg ataacacctg 360
 aggggggtgca tcgccgaggt gattgaacgg ctggccacgt tcatcatcgg ctaagggggc 420
 tgaatcccct gggttgtcac cagaacggtt cgcagtcggg cgtttcgcaa gtgggtggagc 480
 acttctgggt gaaaatagta gcgaagtatc gctctgcgcc caccgtctt ccgtctctcc 540
 cttgtgccaa ggctgaaaat ggatcccctg acacgaggta gtt atg tct gaa att 595

Met Ser Glu Ile

1

gtt gtc tcc aaa ttt ggc ggt acc agc gta gct gat ttt gac gcc atg 643
 Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp Phe Asp Ala Met
 5 10 15 20
 aac cgc agc gct gat att gtg ctt tct gat gcc aac gtg cgt tta gtt 691
 Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn Val Arg Leu Val
 25 30 35
 gtc ctc tcg gct tct gct ggt atc act aat ctg ctg gtc gct tta gct 739
 Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu Val Ala Leu Ala
 40 45 50
 gaa gga ctg gaa cct ggc gag cga ttc gaa aaa ctc gac gct atc cgc 787

Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu Asp Ala Ile Arg	
55	60
aac atc cag ttt gcc att ctg gaa cgt ctg cgt tac ccg aac gtt atc	835
Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr Pro Asn Val Ile	
70	80
cgt gaa gag att gaa cgt ctg ctg gag aac att act gtt ctg gca gaa	883
Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr Val Leu Ala Glu	
85	90
gcg gcg gcg ctg gca acg tct ccg gcg ctg aca gat gag ctg gtc agc	931
Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp Glu Leu Val Ser	
105	110
cac ggc gag ctg atg tcg acc ctg ctg ttt gtt gag atc ctg cgc gaa	979
His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu Ile Leu Arg Glu	
120	130
cgc gat gtt cag gca cag tgg ttt gat gta cgt aaa gtg atg cgt acc	1027
Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys Val Met Arg Thr	
135	145
aac gac cga ttt ggt cgt gca gag cca gat ata gcc gcg ctg gcg gaa	1075
Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala Ala Leu Ala Glu	
150	160
ctg gcc gcg ctg cag ctg ctc cca cgt ctc aat gaa ggc tta gtg atc	1123
Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu Gly Leu Val Ile	
165	180
acc cag gga ttt atc ggt agc gaa aat aaa ggt cgt aca acg acg ctt	1171
Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg Thr Thr Thr Leu	
185	195
ggc cgt gga ggc agc gat tat acg gca gcc ttg ctg gcg gag gct tta	1219
Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu Ala Glu Ala Leu	
200	210

cac gca tct cgt gtt gat atc tgg acc gac gtc ccg ggc atc tac acc	1267
His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro Gly Ile Tyr Thr	
215 220 225	
acc gat cca cgc gta gtt tcc gca gca aaa cgc att gat gaa atc gcg	1315
Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile Asp Glu Ile Ala	
230 235 240	
ttt gcc gaa gcg gca gag atg gca act ttt ggt gca aaa gta ctg cat	1363
Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala Lys Val Leu His	
245 250 255 260	
ccg gca acg ttg cta ccc gca gta cgc agc gat atc ccg gtc ttt gtc	1411
Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile Pro Val Phe Val	
265 270 275	
ggc tcc agc aaa gac cca cgc gca ggt ggt acg ctg gtg tgc aat aaa	1459
Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu Val Cys Asn Lys	
280 285 290	
act gaa aat ccg ccg ctg ttc cgc gct ctg gcg ctt cgt cgc aat cag	1507
Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu Arg Arg Asn Gln	
295 300 305	
act ctg ctc act ttg cac agc ctg aat atg ctg cat tct cgc ggt ttc	1555
Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His Ser Arg Gly Phe	
310 315 320	
ctc gcg gaa gtt ttc ggc atc ctc gcg cgg cat aat att tcg gta gac	1603
Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn Ile Ser Val Asp	
325 330 335 340	
tta atc acc acg tca gaa gtg agc gtg gca tta acc ctt gat acc acc	1651
Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr Leu Asp Thr Thr	
345 350 355	
ggg tca acc tcc act ggc gat acg ttg ctg acg caa tct ctg ctg atg	1699
Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln Ser Leu Leu Met	

360	365	370	
gag ctt tcc gca ctg tgt cgg gtg gag gtg gaa gaa ggt ctg gcg ctg 1747			
Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu Gly Leu Ala Leu			
375	380	385	
gtc gcg ttg att ggc aat gac ctg tca aaa gcc tgc ggc gtt ggc aaa 1795			
Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys Gly Val Gly Lys			
390	395	400	
gag gta ttc ggc gta ctg gaa ccg ttc aac att cgc atg att tgt tat 1843			
Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg Met Ile Cys Tyr			
405	410	415	420
ggc gca tcc agc cat aac ctg tgc ttc ctg gtg ccc ggc gaa gat gcc 1891			
Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro Gly Glu Asp Ala			
425	430	435	
gag cag gtg gtg caa aaa ctg cat agt aat ttg ttt gag taaatactgt 1940			
Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe Glu			
440	445		
atggcctgga agctatatatt cgggccgtat tgattttctt gtcactatgc tcatcaataa 2000			
acgagcctgt actctgttaa ccagcgtctt tatcggagaa taattgcctt taattttttt 2060			
atctgcatct ctaattaatt atcgaaagag ataaatagtt aagagaaggc aaaatgaata 2120			
ttatcagttc tgctcgcaaa ggaattc 2147			

【0 1 2 7】

<210> 4

<211> 449

<212> PRT

<213> Escherichia coli

<400> 4

Met Ser Glu Ile Val Val Ser Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Ala Asp

1

5

10

15

Phe Asp Ala Met Asn Arg Ser Ala Asp Ile Val Leu Ser Asp Ala Asn
 20 25 30
 Val Arg Leu Val Val Leu Ser Ala Ser Ala Gly Ile Thr Asn Leu Leu
 35 40 45
 Val Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Gly Glu Arg Phe Glu Lys Leu
 50 55 60
 Asp Ala Ile Arg Asn Ile Gln Phe Ala Ile Leu Glu Arg Leu Arg Tyr
 65 70 75 80
 Pro Asn Val Ile Arg Glu Glu Ile Glu Arg Leu Leu Glu Asn Ile Thr
 85 90 95
 Val Leu Ala Glu Ala Ala Ala Leu Ala Thr Ser Pro Ala Leu Thr Asp
 100 105 110
 Glu Leu Val Ser His Gly Glu Leu Met Ser Thr Leu Leu Phe Val Glu
 115 120 125
 Ile Leu Arg Glu Arg Asp Val Gln Ala Gln Trp Phe Asp Val Arg Lys
 130 135 140
 Val Met Arg Thr Asn Asp Arg Phe Gly Arg Ala Glu Pro Asp Ile Ala
 145 150 155 160
 Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Leu Gln Leu Leu Pro Arg Leu Asn Glu
 165 170 175
 Gly Leu Val Ile Thr Gln Gly Phe Ile Gly Ser Glu Asn Lys Gly Arg
 180 185 190
 Thr Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Tyr Thr Ala Ala Leu Leu
 195 200 205
 Ala Glu Ala Leu His Ala Ser Arg Val Asp Ile Trp Thr Asp Val Pro
 210 215 220
 Gly Ile Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Ser Ala Ala Lys Arg Ile
 225 230 235 240
 Asp Glu Ile Ala Phe Ala Glu Ala Ala Glu Met Ala Thr Phe Gly Ala

245	250	255
Lys Val Leu His Pro Ala Thr Leu Leu Pro Ala Val Arg Ser Asp Ile		
260	265	270
Pro Val Phe Val Gly Ser Ser Lys Asp Pro Arg Ala Gly Gly Thr Leu		
275	280	285
Val Cys Asn Lys Thr Glu Asn Pro Pro Leu Phe Arg Ala Leu Ala Leu		
290	295	300
Arg Arg Asn Gln Thr Leu Leu Thr Leu His Ser Leu Asn Met Leu His		
305	310	315
Ser Arg Gly Phe Leu Ala Glu Val Phe Gly Ile Leu Ala Arg His Asn		
325	330	335
Ile Ser Val Asp Leu Ile Thr Thr Ser Glu Val Ser Val Ala Leu Thr		
340	345	350
Leu Asp Thr Thr Gly Ser Thr Ser Thr Gly Asp Thr Leu Leu Thr Gln		
355	360	365
Ser Leu Leu Met Glu Leu Ser Ala Leu Cys Arg Val Glu Val Glu Glu		
370	375	380
Gly Leu Ala Leu Val Ala Leu Ile Gly Asn Asp Leu Ser Lys Ala Cys		
385	390	395
Gly Val Gly Lys Glu Val Phe Gly Val Leu Glu Pro Phe Asn Ile Arg		
405	410	415
Met Ile Cys Tyr Gly Ala Ser Ser His Asn Leu Cys Phe Leu Val Pro		
420	425	430
Gly Glu Asp Ala Glu Gln Val Val Gln Lys Leu His Ser Asn Leu Phe		
435	440	445
Glu		

【 0 1 2 8 】

<210> 5

<211> 1981

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (510)..(1736)

<400> 5

gtttaacgcg gccagtgaat ttgactcggt cccctgcctg gcaaaatcgc acaggatgatg 60
gacaacgtga aatcgcttga aaaagaattg gcacgcctca agtccaagct ggcctcctca 120
caggggggatg acctcgcgac gcaagcgcag gacgtcaacg gcgccaaagt actggcagcc 180
accctcgacg gggcggatgc caatgccttg cgtgaaacca tggataagct caaagataaa 240
ctcaaattctg cagtcattgt gctggcgagc gtggctgacg gttaaagtcag cctggctgcg 300
ggtgtcacta ctgacttgac tggcaaggtc aaagcaggcg aagttggta atcatgtggc 360
tggtcaggtc ggtggcaaag gtggtggtaa accggatatg gcgatggcag gtggtactga 420
gcccgcataat ttgccgcagg ctttggcaag tgtgaaggct tgggtagaaa caaaactaaa 480
ttaatttaat tgattaacag agcgaaata atg gca tta atc gta caa aaa tat 533

Met Ala Leu Ile Val Gln Lys Tyr

1

5

ggt ggt acc tcg gtg gct aat ccc gag cgt atc cgt aat gtg gcg cgt 581
Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Pro Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Arg

10

15

20

cgc gtg gcg cgt tac aag gca ttg ggc cac cag gtg gtg gtt gtg gta 629
Arg Val Ala Arg Tyr Lys Ala Leu Gly His Gln Val Val Val Val Val

25

30

35

40

tcc gca atg tct ggt gaa acc aac cgg ttg atc tca ctg gcc aag gaa 677
Ser Ala Met Ser Gly Glu Thr Asn Arg Leu Ile Ser Leu Ala Lys Glu

45

50

55

atc atg caa gac cct gat cca cgt gag ctg gat gtg atg gta tca acc 725

Ile Met Gln Asp Pro Asp Pro Arg Glu Leu Asp Val Met Val Ser Thr	
60	65
70	
ggt gag cag gtc acc atc ggc atg acg gcc ctg gca ctg atg gag ctt	773
Gly Glu Gln Val Thr Ile Gly Met Thr Ala Leu Ala Leu Met Glu Leu	
75	80
85	
ggc att aag gca aaa agc tat acc ggt acc cag gtt aag atc ttg act	821
Gly Ile Lys Ala Lys Ser Tyr Thr Gly Thr Gln Val Lys Ile Leu Thr	
90	95
100	
gac gat gct ttt acc aag gca cgt att ctg gat atc gac gaa cat aac	869
Asp Asp Ala Phe Thr Lys Ala Arg Ile Leu Asp Ile Asp Glu His Asn	
105	110
115	120
ctg aaa aaa gac ctg gat gat ggc tat gtc tgc gtg gtg gct ggg ttc	917
Leu Lys Lys Asp Leu Asp Asp Gly Tyr Val Cys Val Val Ala Gly Phe	
125	130
135	
cag ggc gtg gat gcc aat ggc aat att acg acc ttg ggc cgt ggc ggc	965
Gln Gly Val Asp Ala Asn Gly Asn Ile Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly	
140	145
150	
tca gat act act ggt gta gca ctg gct gcg gcg tta aag gcg gat gaa	1013
Ser Asp Thr Thr Gly Val Ala Leu Ala Ala Ala Leu Lys Ala Asp Glu	
155	160
165	
tgt cag att tat acc gat gtc gat ggc gtt tac acc acc gat ccg cgt	1061
Cys Gln Ile Tyr Thr Asp Val Asp Gly Val Tyr Thr Thr Asp Pro Arg	
170	175
180	
gtg gtg cct gag gca cgc cgc ttg gat aaa att acc ttt gaa gaa atg	1109
Val Val Pro Glu Ala Arg Arg Leu Asp Lys Ile Thr Phe Glu Glu Met	
185	190
195	200
ttg gaa ctg gct tca cag ggc tcc aaa gta ttg caa att cgc tgc gtt	1157
Leu Glu Leu Ala Ser Gln Gly Ser Lys Val Leu Gln Ile Arg Ser Val	
205	210
215	

gag ttt gcc ggt aaa tac aaa gtc aaa tta cgt gtg ctg tcc agc ttc 1205

Glu Phe Ala Gly Lys Tyr Lys Val Lys Leu Arg Val Leu Ser Ser Phe

220

225

230

gaa gag gag ggc gac ggt aca ctg atc aca ttc gaa gaa aat gag gaa 1253

Glu Glu Glu Gly Asp Gly Thr Leu Ile Thr Phe Glu Glu Asn Glu Glu

235

240

245

aac atg gaa gaa cca att atc tcc ggc atc gcc ttt aac cgc gat gag 1301

Asn Met Glu Glu Pro Ile Ile Ser Gly Ile Ala Phe Asn Arg Asp Glu

250

255

260

gcg aaa att acc gtg acg ggc gtg ccc gac aaa cca gga att gcc tat 1349

Ala Lys Ile Thr Val Thr Gly Val Pro Asp Lys Pro Gly Ile Ala Tyr

265

270

275

280

cag att ttg ggc ccg gtg gca gac gcc aat att gat gtg gat atg att 1397

Gln Ile Leu Gly Pro Val Ala Asp Ala Asn Ile Asp Val Asp Met Ile

285

290

295

atc cag aac gtc ggt gcg gat ggt acg act gac ttc acc ttt acc gta 1445

Ile Gln Asn Val Gly Ala Asp Gly Thr Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val

300

305

310

cat aaa aat gag atg aac aaa gcc ctg agc att ctt aga gat aaa gtg 1493

His Lys Asn Glu Met Asn Lys Ala Leu Ser Ile Leu Arg Asp Lys Val

315

320

325

cag ggc cat atc cag gca cgt gaa atc agc ggc gac gac aag att gcc 1541

Gln Gly His Ile Gln Ala Arg Glu Ile Ser Gly Asp Asp Lys Ile Ala

330

335

340

aaa gtc tct gtg gtt ggg gtg ggt atg cgc tca cat gta ggg atc gcc 1589

Lys Val Ser Val Val Gly Val Gly Met Arg Ser His Val Gly Ile Ala

345

350

355

360

agc cag atg ttc cgt acg ctg gcc gaa gaa ggg atc aat att caa atg 1637

Ser Gln Met Phe Arg Thr Leu Ala Glu Glu Gly Ile Asn Ile Gln Met

365	370	375	
atc tca acc agc gaa att aaa att gca gtc gtg atc gaa gag aag tac			1685
Ile Ser Thr Ser Glu Ile Lys Ile Ala Val Val Ile Glu Glu Lys Tyr			
380	385	390	
atg gaa ctg gct gta cgc gtg ttg cat aaa gca ttc ggc ctc gaa aac			1733
Met Glu Leu Ala Val Arg Val Leu His Lys Ala Phe Gly Leu Glu Asn			
395	400	405	
gca taatcgccaa cggacgaata aagaaataaa acattcttct tttttgcgtt			1786
Ala			
gatttttgaa gggttttcac gtagtatggc agcccttcga tgcagtagca atgctgcaaa			1846
gagaacagca tgccgctgtg ttggtactat taaaacttca ttgttttaat aaggtagagg			1906
ggatcctcta gattcgacct gcaggcatgc aagcttggcc gtaatccatg gtcatactg			1966
tttcctgggtg tgaaa			1981

[0 1 2 9]

<210> 6

<211> 409

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 6

Met Ala Leu Ile Val Gln Lys Tyr Gly Gly Thr Ser Val Ala Asn Pro			
1	5	10	15
Glu Arg Ile Arg Asn Val Ala Arg Arg Val Ala Arg Tyr Lys Ala Leu			
20	25	30	
Gly His Gln Val Val Val Val Val Ser Ala Met Ser Gly Glu Thr Asn			
35	40	45	
Arg Leu Ile Ser Leu Ala Lys Glu Ile Met Gln Asp Pro Asp Pro Arg			
50	55	60	
Glu Leu Asp Val Met Val Ser Thr Gly Glu Gln Val Thr Ile Gly Met			

65	70	75	80
Thr Ala Leu Ala Leu Met Glu Leu Gly Ile Lys Ala Lys Ser Tyr Thr			
85	90	95	
Gly Thr Gln Val Lys Ile Leu Thr Asp Asp Ala Phe Thr Lys Ala Arg			
100	105	110	
Ile Leu Asp Ile Asp Glu His Asn Leu Lys Lys Asp Leu Asp Asp Gly			
115	120	125	
Tyr Val Cys Val Val Ala Gly Phe Gln Gly Val Asp Ala Asn Gly Asn			
130	135	140	
Ile Thr Thr Leu Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr Thr Gly Val Ala Leu			
145	150	155	160
Ala Ala Ala Leu Lys Ala Asp Glu Cys Gln Ile Tyr Thr Asp Val Asp			
165	170	175	
Gly Val Tyr Thr Thr Asp Pro Arg Val Val Pro Glu Ala Arg Arg Leu			
180	185	190	
Asp Lys Ile Thr Phe Glu Glu Met Leu Glu Leu Ala Ser Gln Gly Ser			
195	200	205	
Lys Val Leu Gln Ile Arg Ser Val Glu Phe Ala Gly Lys Tyr Lys Val			
210	215	220	
Lys Leu Arg Val Leu Ser Ser Phe Glu Glu Glu Gly Asp Gly Thr Leu			
225	230	235	240
Ile Thr Phe Glu Glu Asn Glu Glu Asn Met Glu Glu Pro Ile Ile Ser			
245	250	255	
Gly Ile Ala Phe Asn Arg Asp Glu Ala Lys Ile Thr Val Thr Gly Val			
260	265	270	
Pro Asp Lys Pro Gly Ile Ala Tyr Gln Ile Leu Gly Pro Val Ala Asp			
275	280	285	
Ala Asn Ile Asp Val Asp Met Ile Ile Gln Asn Val Gly Ala Asp Gly			
290	295	300	

Thr Thr Asp Phe Thr Phe Thr Val His Lys Asn Glu Met Asn Lys Ala
 305 310 315 320
 Leu Ser Ile Leu Arg Asp Lys Val Gln Gly His Ile Gln Ala Arg Glu
 325 330 335
 Ile Ser Gly Asp Asp Lys Ile Ala Lys Val Ser Val Val Gly Val Gly
 340 345 350
 Met Arg Ser His Val Gly Ile Ala Ser Gln Met Phe Arg Thr Leu Ala
 355 360 365
 Glu Glu Gly Ile Asn Ile Gln Met Ile Ser Thr Ser Glu Ile Lys Ile
 370 375 380
 Ala Val Val Ile Glu Glu Lys Tyr Met Glu Leu Ala Val Arg Val Leu
 385 390 395 400
 His Lys Ala Phe Gly Leu Glu Asn Ala
 405

【0 1 3 0】

<210> 7

<211> 1452

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (98)..(1207)

<400> 7

gcatgccgc aggtcgactc tagaggatcc cctgttcaa aaatcttcca aataatcact 60

gtaatgccgg gttgtccggc tgaaatatcg agtcact atg tta aaa gta ggg ttt 115

Met Leu Lys Val Gly Phe

	1	5	
gta ggc tgg cgt ggc atg gtt gga tcc gtg cta atg cag cgc atg atg	163		
Val Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val Leu Met Gln Arg Met Met			
10 15 20			
cag gaa aac gat ttt gcg gat att gaa ccg caa ttc ttt acg acc tca	211		
Gln Glu Asn Asp Phe Ala Asp Ile Glu Pro Gln Phe Phe Thr Thr Ser			
25 30 35			
caa acg gga ggg gct gcg cct aaa gtt gga aaa gat act cct gcg ctg	259		
Gln Thr Gly Gly Ala Ala Pro Lys Val Gly Lys Asp Thr Pro Ala Leu			
40 45 50			
aaa gat gcc aag gat att gat gct ttg cgc cag atg gat gtg att gtg	307		
Lys Asp Ala Lys Asp Ile Asp Ala Leu Arg Gln Met Asp Val Ile Val			
55 60 65 70			
acc tgc cag ggt ggc gat tac acg agt gac gtc ttc cca caa ttg cgc	355		
Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Ser Asp Val Phe Pro Gln Leu Arg			
75 80 85			
gca acc ggc tgg agc ggc cac tgg att gac gcg gcc tct acc tta cgc	403		
Ala Thr Gly Trp Ser Gly His Trp Ile Asp Ala Ala Ser Thr Leu Arg			
90 95 100			
atg gaa aaa gac tcc gtg atc att tta gac ccg gtg aac atg cat gtg	451		
Met Glu Lys Asp Ser Val Ile Ile Leu Asp Pro Val Asn Met His Val			
105 110 115			
att aaa gat gca ttg tcc aat ggc ggc aaa aac tgg atc ggc ggc aac	499		
Ile Lys Asp Ala Leu Ser Asn Gly Gly Lys Asn Trp Ile Gly Gly Asn			
120 125 130			
tgt acc gtc tca ctt atg ttg atg gcg ctg aat ggc ctg ttt aag gct	547		
Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ala Leu Asn Gly Leu Phe Lys Ala			
135 140 145 150			
gac ctg gtc gag tgg gcc act tcc atg acc tac cag gcg gct tca ggc	595		

Asp Leu Val Glu Trp Ala Thr Ser Met Thr Tyr Gln Ala Ala Ser Gly	
155	160
gca ggc gcg cag aat atg cgt gaa ctg att agc cag atg ggc gta gtg	643
Ala Gly Ala Gln Asn Met Arg Glu Leu Ile Ser Gln Met Gly Val Val	
170	175
aat gcc tcc gtg gct gat ttg ctg gcg gat cca gct tct gcc att ttg	691
Asn Ala Ser Val Ala Asp Leu Leu Ala Asp Pro Ala Ser Ala Ile Leu	
185	190
cag atc gat aaa aca gtg gcg gat acc atc cgt agc gaa gag ttg cct	739
Gln Ile Asp Lys Thr Val Ala Asp Thr Ile Arg Ser Glu Glu Leu Pro	
200	205
aaa tct aac ttt ggt gtg cca ttg gcg ggc agt ctg atc cca tgg atc	787
Lys Ser Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly Ser Leu Ile Pro Trp Ile	
215	220
gac aag gac tta ggg aat ggt caa agt aaa gaa gaa tgg aag ggc ggc	835
Asp Lys Asp Leu Gly Asn Gly Gln Ser Lys Glu Glu Trp Lys Gly Gly	
235	240
gta nag acc aat aag att tta ggt cgt gaa gcg aac ccg att gtg att	883
Val Xaa Thr Asn Lys Ile Leu Gly Arg Glu Ala Asn Pro Ile Val Ile	
250	255
gac ggt ttg tgt gta cgt atc ggc gcc atg cgt tgc cat tca caa gcg	931
Asp Gly Leu Cys Val Arg Ile Gly Ala Met Arg Cys His Ser Gln Ala	
265	270
ttg act atc aag ctg cgc aag gat gtg ccg ctg gat gaa atc aat cag	979
Leu Thr Ile Lys Leu Arg Lys Asp Val Pro Leu Asp Glu Ile Asn Gln	
280	285
atg ctg gct gaa gcg aac gac tgg gct aaa gtc att ccc aat gag cgt	1027
Met Leu Ala Glu Ala Asn Asp Trp Ala Lys Val Ile Pro Asn Glu Arg	
295	300
	305
	310

gag gtc agt atg cgg gaa ctc acc ccg gca gcg att acc ggc agt ctg 1075

Glu Val Ser Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala Ala Ile Thr Gly Ser Leu

315

320

325

gcg acg cca gta ggg cgt ttg cgc aaa ctg gcg atg ggt ggt gaa tac 1123

Ala Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu Ala Met Gly Gly Glu Tyr

330

335

340

ttg tgc gca ttt acc gta ggt gac cag ttg tta tgg ggc gct gcc gaa 1171

Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu Leu Trp Gly Ala Ala Glu

345

350

355

cct ttg cgc aga atg ttg agg att ctg gtc gaa tct taagtaattg 1217

Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Ile Leu Val Glu Ser

360

365

370

ttaagtagc agcccgtaaa gctatgattt atcaataaaa tcatggtctt ttcgggcttt 1277

tgcttttggt gcaatcctgt ttaatggta ttgtagcctc aaatcctgta tttattgctc 1337

tcaagccgcc tgggtgcgt tgcgtggctg ggtgaatgat gctattttga caaacgccat 1397

gaattactaa gggtaaatcg gtgagtaaatt ttcaattaaa aaaaatagcc ttgac 1452

【 0 1 3 1 】

<210> 8

<211> 370

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 8

Met Leu Lys Val Gly Phe Val Gly Trp Arg Gly Met Val Gly Ser Val

1

5

10

15

Leu Met Gln Arg Met Met Gln Glu Asn Asp Phe Ala Asp Ile Glu Pro

20

25

30

Gln Phe Phe Thr Thr Ser Gln Thr Gly Gly Ala Ala Pro Lys Val Gly

35

40

45

Lys Asp Thr Pro Ala Leu Lys Asp Ala Lys Asp Ile Asp Ala Leu Arg
 50 55 60
 Gln Met Asp Val Ile Val Thr Cys Gln Gly Gly Asp Tyr Thr Ser Asp
 65 70 75 80
 Val Phe Pro Gln Leu Arg Ala Thr Gly Trp Ser Gly His Trp Ile Asp
 85 90 95
 Ala Ala Ser Thr Leu Arg Met Glu Lys Asp Ser Val Ile Ile Leu Asp
 100 105 110
 Pro Val Asn Met His Val Ile Lys Asp Ala Leu Ser Asn Gly Gly Lys
 115 120 125
 Asn Trp Ile Gly Gly Asn Cys Thr Val Ser Leu Met Leu Met Ala Leu
 130 135 140
 Asn Gly Leu Phe Lys Ala Asp Leu Val Glu Trp Ala Thr Ser Met Thr
 145 150 155 160
 Tyr Gln Ala Ala Ser Gly Ala Gly Ala Gln Asn Met Arg Glu Leu Ile
 165 170 175
 Ser Gln Met Gly Val Val Asn Ala Ser Val Ala Asp Leu Leu Ala Asp
 180 185 190
 Pro Ala Ser Ala Ile Leu Gln Ile Asp Lys Thr Val Ala Asp Thr Ile
 195 200 205
 Arg Ser Glu Glu Leu Pro Lys Ser Asn Phe Gly Val Pro Leu Ala Gly
 210 215 220
 Ser Leu Ile Pro Trp Ile Asp Lys Asp Leu Gly Asn Gly Gln Ser Lys
 225 230 235 240
 Glu Glu Trp Lys Gly Gly Val Xaa Thr Asn Lys Ile Leu Gly Arg Glu
 245 250 255
 Ala Asn Pro Ile Val Ile Asp Gly Leu Cys Val Arg Ile Gly Ala Met
 260 265 270
 Arg Cys His Ser Gln Ala Leu Thr Ile Lys Leu Arg Lys Asp Val Pro

275 280 285
 Leu Asp Glu Ile Asn Gln Met Leu Ala Glu Ala Asn Asp Trp Ala Lys
 290 295 300
 Val Ile Pro Asn Glu Arg Glu Val Ser Met Arg Glu Leu Thr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ala Ile Thr Gly Ser Leu Ala Thr Pro Val Gly Arg Leu Arg Lys Leu
 325 330 335
 Ala Met Gly Gly Glu Tyr Leu Ser Ala Phe Thr Val Gly Asp Gln Leu
 340 345 350
 Leu Trp Gly Ala Ala Glu Pro Leu Arg Arg Met Leu Arg Ile Leu Val
 355 360 365
 Glu Ser

370

【 0 1 3 2 】

<210> 9

<211> 3098

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (1268)..(2155)

<400> 9

cgtagcaact tgcattgcctg ccggtcgctc tagaggatca attgctggca acatttgagt 60
 acattattcg cctttgcatg gtaaaggcct atggtcttga tgtaactttc aagacctgcc 120
 agccccaaat ccaggatagc ctgcggtgtg ttggccacct tgaacaattt gcgggtggca 180
 atattgacac ctttgtctgt cgcctgtgca gacaagatga cggcaatcag taattcgaac 240
 gtggagctat gctccagctc agtgggttga ttggggatgg cttgggccag ccgctcaa 300

atgccagtc tttttgtgc attcataaaa cggtttcaat cataggtcac aggggtcaacc 360
 tgtcttttgc gctttgacgc gcgccatggc tgcggcaatg gcatttttct tgagcacctc 420
 agttgagggt gtctcggtcg tagcaagcgt ctggttgcgt ttgctgtagg tttgggcggt 480
 ctcccgtttt tcaagggcga ggcgagaaaag gcgttgcctg tggcgttgtc tcgctaccgc 540
 ggcttcagct tcattcatgg cggtagcccg accgggaatc gtttgcattc gtatgcagtc 600
 caccgggcag ggcggtaaac atagctcaca gccagtgcatt tcctgggaaa tcaccgtatg 660
 catcagtttg gatgcgcccc aaatggcatt aacgggacag gcctgtatac acagggtgca 720
 gccgatgcatt gtttctcat caatcaaggc caccgctttg ggtttgggtg tgccgtgggc 780
 cggatttaat gcctggaaaag gacgttgcag taatttggca agcgcattgaa tgcccgttc 840
 tcctccaggc ggacattggt tgatattggc ctctccgcgg gcgatcgctt cagcataagg 900
 tttgcatccc tcgtaaccgc attggcggca ttgagtttgc ggtaataacc cgtcgatctt 960
 tgcaatgagg tcgacaaaag gttctggcag ctccaggcga gtcccttcga cttcaatcat 1020
 gtgatggcag gtgagtctgc attcggctct ggctaaatag ccgtttaaga tgggttgcta 1080
 agagttttat tataaccgaa accttgcttt tcctttggcc gggagctagg cggaanaagc 1140
 ttgccgcagt tgggtgccag tgattttgcc gccgtcttgc gcttgtatcc gtccagatac 1200
 agcaagtagg cgcgttcttt ggcgttagac cggataatca gttaaaatat tcgctttatt 1260
 cttaaag atg gcg cta ggt atg tta acg ggc agt ttg gtc gca atc gtg 1309

Met Ala Leu Gly Met Leu Thr Gly Ser Leu Val Ala Ile Val

1

5

10

acc ccc atg ttt gaa gat gga cgt ttg gat ctg gac gcc ctc aaa aag 1357

Thr Pro Met Phe Glu Asp Gly Arg Leu Asp Leu Asp Ala Leu Lys Lys

15

20

25

30

ctg gtc gac ttt cat gta gag gca ggg aca gat ggt att gtc atc gtt 1405

Leu Val Asp Phe His Val Glu Ala Gly Thr Asp Gly Ile Val Ile Val

35

40

45

ggc acg act ggc gag tcg ccc acg gtg gat gta gat gag cat tgt ctg 1453

Gly Thr Thr Gly Glu Ser Pro Thr Val Asp Val Asp Glu His Cys Leu

50

55

60

ctg atc aaa acc acg atc gag cat gtc gcc aag cgc gtg cca gtc att 1501

Leu Ile Lys Thr Thr Ile Glu His Val Ala Lys Arg Val Pro Val Ile
 65 70 75
 gcc ggt act ggc gca aat tcc act gct gaa gcc att gaa ctg act gcc 1549
 Ala Gly Thr Gly Ala Asn Ser Thr Ala Glu Ala Ile Glu Leu Thr Ala
 80 85 90
 aag gcc aag gcg ctt ggc gca gac gcc tgc ctg ctg gtg gca ccg tat 1597
 Lys Ala Lys Ala Leu Gly Ala Asp Ala Cys Leu Leu Val Ala Pro Tyr
 95 100 105 110
 tac aac aag ccc tcg caa gag ggt ttg tac cag cac ttt aaa gcc gtg 1645
 Tyr Asn Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Val
 115 120 125
 gct gag gcg gtc gat att ccg caa att ctc tat aat gtg cca ggc cgc 1693
 Ala Glu Ala Val Asp Ile Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Gly Arg
 130 135 140
 acc ggt tgc gac ttg tct aac gac acc gta ttg cgc ctg gcg cag att 1741
 Thr Gly Cys Asp Leu Ser Asn Asp Thr Val Leu Arg Leu Ala Gln Ile
 145 150 155
 cgc aac att gtc ggg att aag gat gcg act gga ggg att gag cgc ggt 1789
 Arg Asn Ile Val Gly Ile Lys Asp Ala Thr Gly Gly Ile Glu Arg Gly
 160 165 170
 acc gat ttg ttg ttg cgt gca cca gct gat ttc gcc att tac agc ggg 1837
 Thr Asp Leu Leu Leu Arg Ala Pro Ala Asp Phe Ala Ile Tyr Ser Gly
 175 180 185 190
 gat gat gcc act gcg ctg gcc ctg atg tta tta ggg ggg aaa ggc gtg 1885
 Asp Asp Ala Thr Ala Leu Ala Leu Met Leu Leu Gly Gly Lys Gly Val
 195 200 205
 att tcg gtc acg gcc aat gtc gcg ccc aaa tta atg cat gaa atg tgc 1933
 Ile Ser Val Thr Ala Asn Val Ala Pro Lys Leu Met His Glu Met Cys
 210 215 220

gag cat gct ttg aat ggc aac ctg gcc gca gcc aaa gcg gcc aat gcc 1981
 Glu His Ala Leu Asn Gly Asn Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asn Ala
 225 230 235
 aaa ctg ttt gca ttg cac cag aag ttg ttt gta gaa gcg aac ccg att 2029
 Lys Leu Phe Ala Leu His Gln Lys Leu Phe Val Glu Ala Asn Pro Ile
 240 245 250
 cca gtg aaa tgg gta tta caa caa atg gga atg att gcc act ggc atc 2077
 Pro Val Lys Trp Val Leu Gln Gln Met Gly Met Ile Ala Thr Gly Ile
 255 260 265 270
 cgt ttg ccg ctg gtc aat tta tcc agc caa tat cat gaa gta ttg cgc 2125
 Arg Leu Pro Leu Val Asn Leu Ser Ser Gln Tyr His Glu Val Leu Arg
 275 280 285
 aac gcc atg aag cag gca gaa att gcc gct tgatcggcta aaactaattt 2175
 Asn Ala Met Lys Gln Ala Glu Ile Ala Ala
 290 295
 aggggtgaaac aagtgaaata catgagtcac gtttggttac aacgtttggt gctggccagt 2235
 ctggctcacag cgctttcagc gtgcgattcc atcccgttta ttgataatag ttctgactac 2295
 aagggcgcag gtcgctccag gccacttgaa gtgccgccag acctgaccgc ggtgcgtacc 2355
 agcagtactt acaatgtgcc tggtagcacc agttactctg cctatagcca gaaccaggaa 2415
 gtgcaagagc agaatgggcc acagcctgtg ctgcagata tgaaaaacgt gcgcatgggtg 2475
 aaagcaggcc agcagcgttg gctgggtggc aatgcgcctc cggaaaaaat ctggccgatt 2535
 gtgcgtgatt tctggctgga tcaaggcttt gctgtcaggg tagagaatcc tgagcttggc 2595
 gtgattgaaa ccgagtgggt gcaatctgat gccatcaagc ctaaggaaga taaccgtggc 2655
 tatggtgaaa agtttgatgc ctggctggat aaactttctg gttttgccga caggcgtaaa 2715
 ttccgtacgc gtctggaacg tggggagaaa gacggcacca ccgaaatcta tatgacgcac 2775
 cgtactgtcg ccggtgcacc ggatgatggc aaaaattatg tgcagacca attgggtgtc 2835
 attgataccg gttatcgccc caacgcggct gaaaacaaga acaatgccgg taaagagttt 2895
 gatgctgact tggatgcaga attactccgt cgaatgatgg tgaaattagg tctggatgag 2955
 cagaaagcag accaggtgat ggcacaatct gcttcagaca agcgtgcaga tgtggtcaag 3015

gagtcctgacc agagcgtcac ctggaagttg aatgagccgt ttgaccgtgc ctggcgccgt 3075
gtggcctggc ctggatcccc ggg 3098

【 0 1 3 3 】

<210> 10

<211> 296

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 10

Met Ala Leu Gly Met Leu Thr Gly Ser Leu Val Ala Ile Val Thr Pro

1 5 10 15

Met Phe Glu Asp Gly Arg Leu Asp Leu Asp Ala Leu Lys Lys Leu Val

20 25 30

Asp Phe His Val Glu Ala Gly Thr Asp Gly Ile Val Ile Val Gly Thr

35 40 45

Thr Gly Glu Ser Pro Thr Val Asp Val Asp Glu His Cys Leu Leu Ile

50 55 60

Lys Thr Thr Ile Glu His Val Ala Lys Arg Val Pro Val Ile Ala Gly

65 70 75 80

Thr Gly Ala Asn Ser Thr Ala Glu Ala Ile Glu Leu Thr Ala Lys Ala

85 90 95

Lys Ala Leu Gly Ala Asp Ala Cys Leu Leu Val Ala Pro Tyr Tyr Asn

100 105 110

Lys Pro Ser Gln Glu Gly Leu Tyr Gln His Phe Lys Ala Val Ala Glu

115 120 125

Ala Val Asp Ile Pro Gln Ile Leu Tyr Asn Val Pro Gly Arg Thr Gly

130 135 140

Cys Asp Leu Ser Asn Asp Thr Val Leu Arg Leu Ala Gln Ile Arg Asn

145 150 155 160

Ile Val Gly Ile Lys Asp Ala Thr Gly Gly Ile Glu Arg Gly Thr Asp
 165 170 175
 Leu Leu Leu Arg Ala Pro Ala Asp Phe Ala Ile Tyr Ser Gly Asp Asp
 180 185 190
 Ala Thr Ala Leu Ala Leu Met Leu Leu Gly Gly Lys Gly Val Ile Ser
 195 200 205
 Val Thr Ala Asn Val Ala Pro Lys Leu Met His Glu Met Cys Glu His
 210 215 220
 Ala Leu Asn Gly Asn Leu Ala Ala Ala Lys Ala Ala Asn Ala Lys Leu
 225 230 235 240
 Phe Ala Leu His Gln Lys Leu Phe Val Glu Ala Asn Pro Ile Pro Val
 245 250 255
 Lys Trp Val Leu Gln Gln Met Gly Met Ile Ala Thr Gly Ile Arg Leu
 260 265 270
 Pro Leu Val Asn Leu Ser Ser Gln Tyr His Glu Val Leu Arg Asn Ala
 275 280 285
 Met Lys Gln Ala Glu Ile Ala Ala
 290 295

【 0 1 3 4 】

<210> 11

<211> 3390

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (2080)..(2883)

<400> 11

ccgcaggtcg ctctagagga tcagagttgg acggacaagc tgaagttttg ggagtctgaa 60
 gaagctgcgg gcgaagtgat aaagcagctg aatcaactgt agccactgca agcgacgaat 120
 gaaagcaaag gcgctgcact cgctaaggat gaggcagccg aatctcagaa aaccacgtca 180
 gagcctgtca aggccgagca agaggtattg cctcggcca ctgcaacaaa taattcagct 240
 gctgcagcga cattggctga agaagaagtg gttccctaca ttccggaggg ggagtatcag 300
 gctgcaccca ctccagaaga gatggccaag ggtaatctgg atgtcagtga aaaccaggtt 360
 actgaggcta aggcacatcc agtgaatgaa aaggaaatgg ctgcccacaaat tgcagatacg 420
 gttgagccac caccggtttt tcagcaggaa ccgatggcag aacctattgt agcggctgaa 480
 cccgaaccgg tattgccacc gcccgtaaaa gccgaaccag ctgtgaagaa tatcacagcg 540
 ccagttgttg ccgcagccac tgttcagcgg gcggcaacca agactgctga atctgagtca 600
 gttaaatacca aacctgttga tcctaagcct gtggaagcaa aaaccgctgt atcaaaaact 660
 gaagtacaaa caccgcgggc acaggcacct gctgcggcag cggccgttga agatgacgag 720
 gtcatccat atattcccga aggtgaatat gtggctcctg tcatcctag tgaggccgaa 780
 atggttaaag gcaatatggc ggaggcaaat gcacctgcga ctgatgctca agcgcgccag 840
 gtaactgaaa aaggggtggc acccacatcg gatgcggcag cagagccatc accgacattt 900
 gtcgctgagc aattgccaga accagagcca gaacctgaat tgccaccgcc gcctccgcca 960
 tccgtcagca agcctgttgt gagagaggta gcgccagtgg ctgcgctggc agcagaagaa 1020
 gagaaaccag tcgctgcga gcctgagact gagcagccgg ctgccaaggt tgttgagcct 1080
 gcatcggctg cctccccctg ggcgacgcca gaagcgccag ctggtgatgc tgaaatcaac 1140
 caggctgttg cggcatgggc acaagcttgg cgcagcaagg acattaaaaa ctacctcgt 1200
 gcatatgccc ctgacttcat gccagaaggg ttgccttcca gaaaggcatg ggagtcgcaa 1260
 cgcaaacagc gtttatctgc aggccagggt gcgattacac tcgtactaaa taatgtgcag 1320
 attcagcgtg acggtaccac tgcgcccgtg cagtttgagc aaaaatatgc tgctaaagtt 1380
 tataaagatg aattggtaaa aacactggaa atgcgttacg agccaacgca gaaacgttgg 1440
 ttgatcacac gtgaacgtgt tgccccctta accggtttgc cagtagcgag tgtgccaacg 1500
 acccgtctgc cagcagtcgc tgcagcgtca tccaatacgg atgtggtcga gtcagctgtg 1560
 ccaccgacac aatcgacatc atctgcgcct gtagcggaag tgagtgttga atcagcgatt 1620
 gacgcctggg cacaggcttg gcgcagtaaa aacatcaatg ctactttgc ggcgtattct 1680
 ccagaatttg tgccggaggg attgccaac agaggtgtct gggaagcgca acgtaaaaag 1740

cgcttgtccc cacagcaggg caagatcagc ctggatgtca cgaatgtaag cgtgagccgc 1800
 gaaggagaaa cagccgtggc cacctttagg cagaaatatg cgtctaaggc ctatcgtgat 1860
 gaagtagtga agcgtctaca gttaaaactg gatgctgcaa gcaatcgctg gctgattgtg 1920
 cgtgaaagta ccggtagtga ggcagaagtg ccaatgggca agcagtcagt gagtgcgcca 1980
 gaagagagct cggaacatca ggatggtgct ctggagccga tcggatttta atggtctgct 2040
 gatgtcgtgg ttttaagtatt aaaaataatt gagtgagtt atg ttg aaa gta gtg 2094

Met Leu Lys Val Val

1 5

att gct ggc gtg tct ggt cgt atg gga cat gcc tta ctg gat gga gtt 2142
 Ile Ala Gly Val Ser Gly Arg Met Gly His Ala Leu Leu Asp Gly Val

10 15 20

ttt tct gat aac ggc ttg cag ttg cac gcg gca ctc gat cgt gct gaa 2190
 Phe Ser Asp Asn Gly Leu Gln Leu His Ala Ala Leu Asp Arg Ala Glu

25 30 35

agc gcc atg ata ggg cgg gat gca ggc gag cag ttt ggc aag gtc agt 2238
 Ser Ala Met Ile Gly Arg Asp Ala Gly Glu Gln Phe Gly Lys Val Ser

40 45 50

ggc gtg aaa atc acg gct gac atc cat gcc gca ttg gtc ggt gcc gat 2286
 Gly Val Lys Ile Thr Ala Asp Ile His Ala Ala Leu Val Gly Ala Asp

55 60 65

gtg ctg gtg gat ttc acg cgg ccg gaa gcc agt atg caa tat tta caa 2334
 Val Leu Val Asp Phe Thr Arg Pro Glu Ala Ser Met Gln Tyr Leu Gln

70 75 80 85

gcc tgc cag caa gcc aac gtt aaa tta gtg att ggt act acc ggg ttt 2382
 Ala Cys Gln Gln Ala Asn Val Lys Leu Val Ile Gly Thr Thr Gly Phe

90 95 100

agt gag gca gaa aag gcc agt att gag gct gcg tcc aaa aat atc ggt 2430
 Ser Glu Ala Glu Lys Ala Ser Ile Glu Ala Ala Ser Lys Asn Ile Gly

105 110 115

atc gta ttt gct cca aac atg agc gta ggg gtc acc ctc ttg att aac	2478
Ile Val Phe Ala Pro Asn Met Ser Val Gly Val Thr Leu Leu Ile Asn	
120 125 130	
ctg gtt gag caa gcc gca cgg gtg ctc aat gaa ggc tat gat att gag	2526
Leu Val Glu Gln Ala Ala Arg Val Leu Asn Glu Gly Tyr Asp Ile Glu	
135 140 145	
gtg gtt gaa atg cat cac cgc cat aag gtg gat gcg cct tca ggc acg	2574
Val Val Glu Met His His Arg His Lys Val Asp Ala Pro Ser Gly Thr	
150 155 160 165	
gct tta cgg ttg ggt gag gct gcg gca aaa ggg att gat aaa gcg ctt	2622
Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ala Ala Ala Lys Gly Ile Asp Lys Ala Leu	
170 175 180	
aaa gat tgt gct gtg tat gcg cgc gaa ggc gtg act ggt gaa cgc gaa	2670
Lys Asp Cys Ala Val Tyr Ala Arg Glu Gly Val Thr Gly Glu Arg Glu	
185 190 195	
gcg ggc acg att ggt ttt gca acc tta cgt ggt ggg gat gtg gtc ggt	2718
Ala Gly Thr Ile Gly Phe Ala Thr Leu Arg Gly Gly Asp Val Val Gly	
200 205 210	
gac cat acg gtg gtt ctg gct ggt gtg ggt gag cga gta gag tta acg	2766
Asp His Thr Val Val Leu Ala Gly Val Gly Glu Arg Val Glu Leu Thr	
215 220 225	
cat aaa gca tca agc cgt gcc aca ttt gca caa ggt gcg tta cgt gcg	2814
His Lys Ala Ser Ser Arg Ala Thr Phe Ala Gln Gly Ala Leu Arg Ala	
230 235 240 245	
gct aaa ttt ctg gct gat aaa ccc aag gga ttg ttt gat atg cgt gat	2862
Ala Lys Phe Leu Ala Asp Lys Pro Lys Gly Leu Phe Asp Met Arg Asp	
250 255 260	
gtg ttg gga ttt gaa aag aac tgatcttttag taggcgatcc cgtctggcta	2913
Val Leu Gly Phe Glu Lys Asn	

265

aggctctggca ggaatcgtct gatgcttctg agttgccctt gagtgggctg tcaatgtacg 2973
 ctataatgct gtaattctga aacgggaaga gtcgaacaag cttttcccgt ttgacacatc 3033
 tattcactgc agcttgaatt tcacttccag ccatggtgaa ccctctaaaa gatgtgtttc 3093
 gtgtcaaact taaggagcta aagggtgtcaa aaacaattcc agcgattctc gtgttagcag 3153
 atggaactgt ttttaagggc attagcattg gcgcttccgg tcatacggta ggtgaggtgg 3213
 tgtttaatac ctccatcacc ggttatcagg agattcttac cgatccttcc tataccgaac 3273
 aaatcgtgac actgacctat ccgcacattg gtaactacgg gaccaatcgt gaagatggga 3333
 gtcaggtaaa gtctatgctg cgggtctgat ccccgggacc gagccgggtt cgtaaag 3390

【0 1 3 5】

<210> 12

<211> 268

<212> PRT

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<400> 12

Met Leu Lys Val Val Ile Ala Gly Val Ser Gly Arg Met Gly His Ala

1 5 10 15

Leu Leu Asp Gly Val Phe Ser Asp Asn Gly Leu Gln Leu His Ala Ala

20 25 30

Leu Asp Arg Ala Glu Ser Ala Met Ile Gly Arg Asp Ala Gly Glu Gln

35 40 45

Phe Gly Lys Val Ser Gly Val Lys Ile Thr Ala Asp Ile His Ala Ala

50 55 60

Leu Val Gly Ala Asp Val Leu Val Asp Phe Thr Arg Pro Glu Ala Ser

65 70 75 80

Met Gln Tyr Leu Gln Ala Cys Gln Gln Ala Asn Val Lys Leu Val Ile

85 90 95

Gly Thr Thr Gly Phe Ser Glu Ala Glu Lys Ala Ser Ile Glu Ala Ala

100	105	110	
Ser Lys Asn Ile Gly Ile Val Phe Ala Pro Asn Met Ser Val Gly Val			
115	120	125	
Thr Leu Leu Ile Asn Leu Val Glu Gln Ala Ala Arg Val Leu Asn Glu			
130	135	140	
Gly Tyr Asp Ile Glu Val Val Glu Met His His Arg His Lys Val Asp			
145	150	155	160
Ala Pro Ser Gly Thr Ala Leu Arg Leu Gly Glu Ala Ala Ala Lys Gly			
165	170	175	
Ile Asp Lys Ala Leu Lys Asp Cys Ala Val Tyr Ala Arg Glu Gly Val			
180	185	190	
Thr Gly Glu Arg Glu Ala Gly Thr Ile Gly Phe Ala Thr Leu Arg Gly			
195	200	205	
Gly Asp Val Val Gly Asp His Thr Val Val Leu Ala Gly Val Gly Glu			
210	215	220	
Arg Val Glu Leu Thr His Lys Ala Ser Ser Arg Ala Thr Phe Ala Gln			
225	230	235	240
Gly Ala Leu Arg Ala Ala Lys Phe Leu Ala Asp Lys Pro Lys Gly Leu			
245	250	255	
Phe Asp Met Arg Asp Val Leu Gly Phe Glu Lys Asn			
260	265		

【 0 1 3 6 】

<210> 13

<211> 2566

<212> DNA

<213> *Methylophilus methylotrophus*

<220>

<221> CDS

<222> (751)..(1995)

<400> 13

tgcttttaggg ggaacctaga ggatccccct acccgaggaa gaagttagcc aacatgtact 60
 tccagtcgta ccatcaaaag tagaagtttt cggcgttatc ctgattcaca gtaaacgaaa 120
 aattgcccac attctgaccg gatttaccgg tggcttttaa ggtataagtg gtcgctgact 180
 ggttctcaat gctgtaatca aaaaatttgg catcactggg gacacaggca aatcccacat 240
 atgtgaagtt gtcctgataa aactgttcgg cctgcacacg gcaattggca agattggcag 300
 gcgcttccgc ggcatcaccg cttttgatgt aatcctgata gcctgggtatg gcgatgctgg 360
 ccaagatacc cataatggcc accacgacca tgacttctat caggctgaat ccgtactgat 420
 ttgaggactt cattatcaaa ccccttttta gatagcctta tcatgcaaac aggagctgt 480
 catgtccagc atcagccgac caatggtcag gattaccgca cgaacggta aaccactaaa 540
 acgcccagtc actggtgccca tgagcaactg cagggttaat gataaaatgg cactcaattt 600
 acattggact gtgaacatgt tttccttcta tacgagatta ttggcggttg ccctgctatt 660
 ggcacaattg agtgcctgtg gtctcaaagg ggacctgtat attcctgagc gccaatatcc 720
 tcaaacgcct caacaagata agtcttcacg gtg acc gct ttt tca atc caa caa 774

Val Thr Ala Phe Ser Ile Gln Gln

1

5

ggc cta cta cat gcc gag aat gta gcc ctg cgt gac att gca caa acg 822

Gly Leu Leu His Ala Glu Asn Val Ala Leu Arg Asp Ile Ala Gln Thr

10

15

20

cat caa acg ccc act tac gtc tat tca cgt gcc gcc ttg acg act gct 870

His Gln Thr Pro Thr Tyr Val Tyr Ser Arg Ala Ala Leu Thr Thr Ala

25

30

35

40

ttc gag cgt ttt cag gca ggc ctg act gga cat gac cat ttg atc tgc 918

Phe Glu Arg Phe Gln Ala Gly Leu Thr Gly His Asp His Leu Ile Cys

45

50

55

ttt gct gtc aaa gcc aac cca agc ctg gcc att ctc aac ctg ttt gcg 966

Phe Ala Val Lys Ala Asn Pro Ser Leu Ala Ile Leu Asn Leu Phe Ala

60	65	70	
cga atg gga gcg ggc ttt gat att gtg tcc ggt ggt gag ctg gca cgc			1014
Arg Met Gly Ala Gly Phe Asp Ile Val Ser Gly Gly Glu Leu Ala Arg			
75	80	85	
gtc ttg gcc gca ggt ggc gac ccg aaa aaa gtg gtg ttt tct ggt gtg			1062
Val Leu Ala Ala Gly Gly Asp Pro Lys Lys Val Val Phe Ser Gly Val			
90	95	100	
ggc aaa tcc cat gcg gaa atc aaa gcc gcg ctt gaa gcg ggc att ctt			1110
Gly Lys Ser His Ala Glu Ile Lys Ala Ala Leu Glu Ala Gly Ile Leu			
105	110	115	120
tgc ttc aac gtg gaa tca gtg aat gag cta gac cgc atc cag cag gtg			1158
Cys Phe Asn Val Glu Ser Val Asn Glu Leu Asp Arg Ile Gln Gln Val			
125	130	135	
gcg gcc agc ctg ggc aaa aaa gcg cct att tcc ctg cgc gtg aac ccc			1206
Ala Ala Ser Leu Gly Lys Lys Ala Pro Ile Ser Leu Arg Val Asn Pro			
140	145	150	
aat gtg gat gcc aaa aca cat ccc tat att tcc cac ccg gct ctc aaa			1254
Asn Val Asp Ala Lys Thr His Pro Tyr Ile Ser His Pro Ala Leu Lys			
155	160	165	
aac aat aaa ttt ggt gtg gca ttt gaa gat gcc ttg ggc ctc tat gaa			1302
Asn Asn Lys Phe Gly Val Ala Phe Glu Asp Ala Leu Gly Leu Tyr Glu			
170	175	180	
aaa gcg gcg caa ctg cca aac atc gag gta cac ggc gta gat tgc cat			1350
Lys Ala Ala Gln Leu Pro Asn Ile Glu Val His Gly Val Asp Cys His			
185	190	195	200
atc ggc tcg caa atc act gag ctg tca cct ttc ctc gat gcc ttg gat			1398
Ile Gly Ser Gln Ile Thr Glu Leu Ser Pro Phe Leu Asp Ala Leu Asp			
205	210	215	
aaa gta ttg ggc ctg gta gat gca ttg gcc gcc aaa ggc att cat atc			1446

Lys Val Leu Gly Leu Val Asp Ala Leu Ala Ala Lys Gly Ile His Ile	
220	225
cag cat ata gac gtt ggc ggc ggt gtc ggt att act tac agc gac gaa	1494
Gln His Ile Asp Val Gly Gly Gly Val Gly Ile Thr Tyr Ser Asp Glu	
235	240
acg cca cca gac ttt gca gcc tac act gca gcg att ctt aaa aag ctg	1542
Thr Pro Pro Asp Phe Ala Ala Tyr Thr Ala Ala Ile Leu Lys Lys Leu	
250	255
gca ggc agg aat gta aaa gtg ttg ttt gag ccc ggc cgt gcc ctg gtg	1590
Ala Gly Arg Asn Val Lys Val Leu Phe Glu Pro Gly Arg Ala Leu Val	
265	270
ggt aac gcc ggt gtg ctg ctg acc aag gtc gaa tac ctg aaa cct ggc	1638
Gly Asn Ala Gly Val Leu Leu Thr Lys Val Glu Tyr Leu Lys Pro Gly	
285	290
gaa acc aaa aac ttt gcg att gtc gat gcc gcc atg aac gac ctc atg	1686
Glu Thr Lys Asn Phe Ala Ile Val Asp Ala Ala Met Asn Asp Leu Met	
300	305
cgc ccg gct ttg tat gat gct ttc cac aac att acg acc att gcc act	1734
Arg Pro Ala Leu Tyr Asp Ala Phe His Asn Ile Thr Thr Ile Ala Thr	
315	320
tct gca gcc ccc gca caa atc tat gag atc gtt ggc ccg gtt tgc gag	1782
Ser Ala Ala Pro Ala Gln Ile Tyr Glu Ile Val Gly Pro Val Cys Glu	
330	335
agt ggt gac ttt tta ggc cat gac cgt aca ctt gcg atc gaa gaa ggt	1830
Ser Gly Asp Phe Leu Gly His Asp Arg Thr Leu Ala Ile Glu Glu Gly	
345	350
gat tac ctg gcg att cac tcc gca ggc gct tat ggc atg agc atg gcc	1878
Asp Tyr Leu Ala Ile His Ser Ala Gly Ala Tyr Gly Met Ser Met Ala	
365	370
	375

agc aac tac aac acg cgc gcc cgt gcc gca gag gta ttg gtt gat ggt 1926

Ser Asn Tyr Asn Thr Arg Ala Arg Ala Ala Glu Val Leu Val Asp Gly

380

385

390

gac cag gtg cat gtg atc cgt gaa cgt gaa caa att gcc gac ctg ttt 1974

Asp Gln Val His Val Ile Arg Glu Arg Glu Gln Ile Ala Asp Leu Phe

395

400

405

aaa ctg gag cgt acg ctg cca taacattgac ggcaaccct aataaaaaaa 2025

Lys Leu Glu Arg Thr Leu Pro

410

415

ccgaagccgc caagcttcgg ttttttatta atagcgcac ctttaataca agatcacggt 2085

cttgttcgcg tagagcaaga ttctatgctc aatatgccag cgcacggctt tggaaagcac 2145

aacacgctcc aggtcacggc ctttctggat caggtcttcc acctgatcgc ggtgtgaaat 2205

gcgcgccaag tcttgetcaa taatcgcccc ctcatccaac acctctgtca cataatgact 2265

ggtcgcaccg atcagtttca cgccacgctc aaacgcacgg tggttaaggac gtgcgccgat 2325

aaatgctggc aggaatgagt ggtggtgaat gttgataatc cgctgaggat accgtgcgac 2385

aaaatctggt gacagaatct gcatgtagcg tgccagcaca atcaggtcaa tcttgtgttg 2445

atcaaacagg gcaaactgct gngcctctac ctctgccttg gtttaccttg gtcacggta 2505

aatagtga aa cgggatgcca taaaactgcg ccagggggat cctctgggtc cccctaaagc 2565

a

2566

[0 1 3 7]

<210> 14

<211> 415

<212> PRT

<213> Methylophilus methylotrophus

<400> 14

Val Thr Ala Phe Ser Ile Gln Gln Gly Leu Leu His Ala Glu Asn Val

1

5

10

15

Ala Leu Arg Asp Ile Ala Gln Thr His Gln Thr Pro Thr Tyr Val Tyr

20	25	30	
Ser Arg Ala Ala Leu Thr Thr Ala Phe Glu Arg Phe Gln Ala Gly Leu			
35	40	45	
Thr Gly His Asp His Leu Ile Cys Phe Ala Val Lys Ala Asn Pro Ser			
50	55	60	
Leu Ala Ile Leu Asn Leu Phe Ala Arg Met Gly Ala Gly Phe Asp Ile			
65	70	75	80
Val Ser Gly Gly Glu Leu Ala Arg Val Leu Ala Ala Gly Gly Asp Pro			
85	90	95	
Lys Lys Val Val Phe Ser Gly Val Gly Lys Ser His Ala Glu Ile Lys			
100	105	110	
Ala Ala Leu Glu Ala Gly Ile Leu Cys Phe Asn Val Glu Ser Val Asn			
115	120	125	
Glu Leu Asp Arg Ile Gln Gln Val Ala Ala Ser Leu Gly Lys Lys Ala			
130	135	140	
Pro Ile Ser Leu Arg Val Asn Pro Asn Val Asp Ala Lys Thr His Pro			
145	150	155	160
Tyr Ile Ser His Pro Ala Leu Lys Asn Asn Lys Phe Gly Val Ala Phe			
165	170	175	
Glu Asp Ala Leu Gly Leu Tyr Glu Lys Ala Ala Gln Leu Pro Asn Ile			
180	185	190	
Glu Val His Gly Val Asp Cys His Ile Gly Ser Gln Ile Thr Glu Leu			
195	200	205	
Ser Pro Phe Leu Asp Ala Leu Asp Lys Val Leu Gly Leu Val Asp Ala			
210	215	220	
Leu Ala Ala Lys Gly Ile His Ile Gln His Ile Asp Val Gly Gly Gly			
225	230	235	240
Val Gly Ile Thr Tyr Ser Asp Glu Thr Pro Pro Asp Phe Ala Ala Tyr			
245	250	255	

Thr Ala Ala Ile Leu Lys Lys Leu Ala Gly Arg Asn Val Lys Val Leu
 260 265 270

Phe Glu Pro Gly Arg Ala Leu Val Gly Asn Ala Gly Val Leu Leu Thr
 275 280 285

Lys Val Glu Tyr Leu Lys Pro Gly Glu Thr Lys Asn Phe Ala Ile Val
 290 295 300

Asp Ala Ala Met Asn Asp Leu Met Arg Pro Ala Leu Tyr Asp Ala Phe
 305 310 315 320

His Asn Ile Thr Thr Ile Ala Thr Ser Ala Ala Pro Ala Gln Ile Tyr
 325 330 335

Glu Ile Val Gly Pro Val Cys Glu Ser Gly Asp Phe Leu Gly His Asp
 340 345 350

Arg Thr Leu Ala Ile Glu Glu Gly Asp Tyr Leu Ala Ile His Ser Ala
 355 360 365

Gly Ala Tyr Gly Met Ser Met Ala Ser Asn Tyr Asn Thr Arg Ala Arg
 370 375 380

Ala Ala Glu Val Leu Val Asp Gly Asp Gln Val His Val Ile Arg Glu
 385 390 395 400

Arg Glu Gln Ile Ala Asp Leu Phe Lys Leu Glu Arg Thr Leu Pro
 405 410 415

【図面の簡単な説明】

【図 1】 変異型dapAを有するプラスミドRSF24Pの製造工程を示す図。「da
 pA^{*}24」は、118位のヒスチジン残基がチロシン残基に置換された変異型DDPSをコ
 ード変異型dapAを表す。

【図 2】 変異型dapA及び変異型lysCを有するプラスミドRSFD80の製造工程
 を示す図。「lysC^{*}80」は、352位のスレオニン残基がイソロイシン残基に置換さ
 れた変異型AKIIIをコード変異型lysCを表す。

【図 3】 ask遺伝子を保持するE. coli形質転換株のアスパルトキナーゼ活
 性を示す図。

【図 4】 asd遺伝子を保持するE. coli形質転換株のアスパラギン酸セミアルデヒド脱水素酵素活性を示す図。

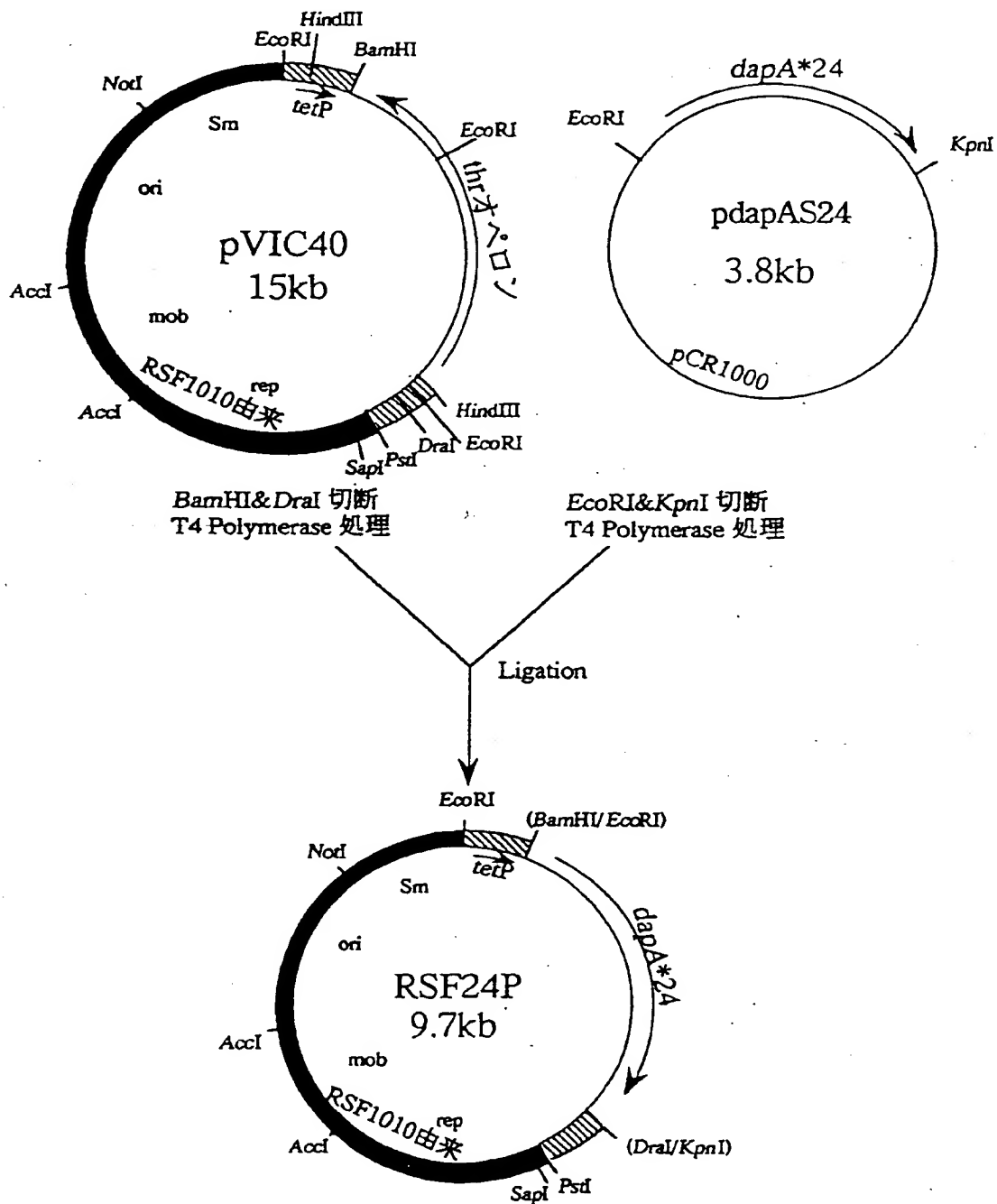
【図 5】 dapA遺伝子を保持するE. coli形質転換株のジヒドロジピコリン酸合成酵素活性を示す図。

【図 6】 dapB遺伝子を保持するE. coli形質転換株のジヒドロジピコリン酸レダクターゼ活性を示す図。

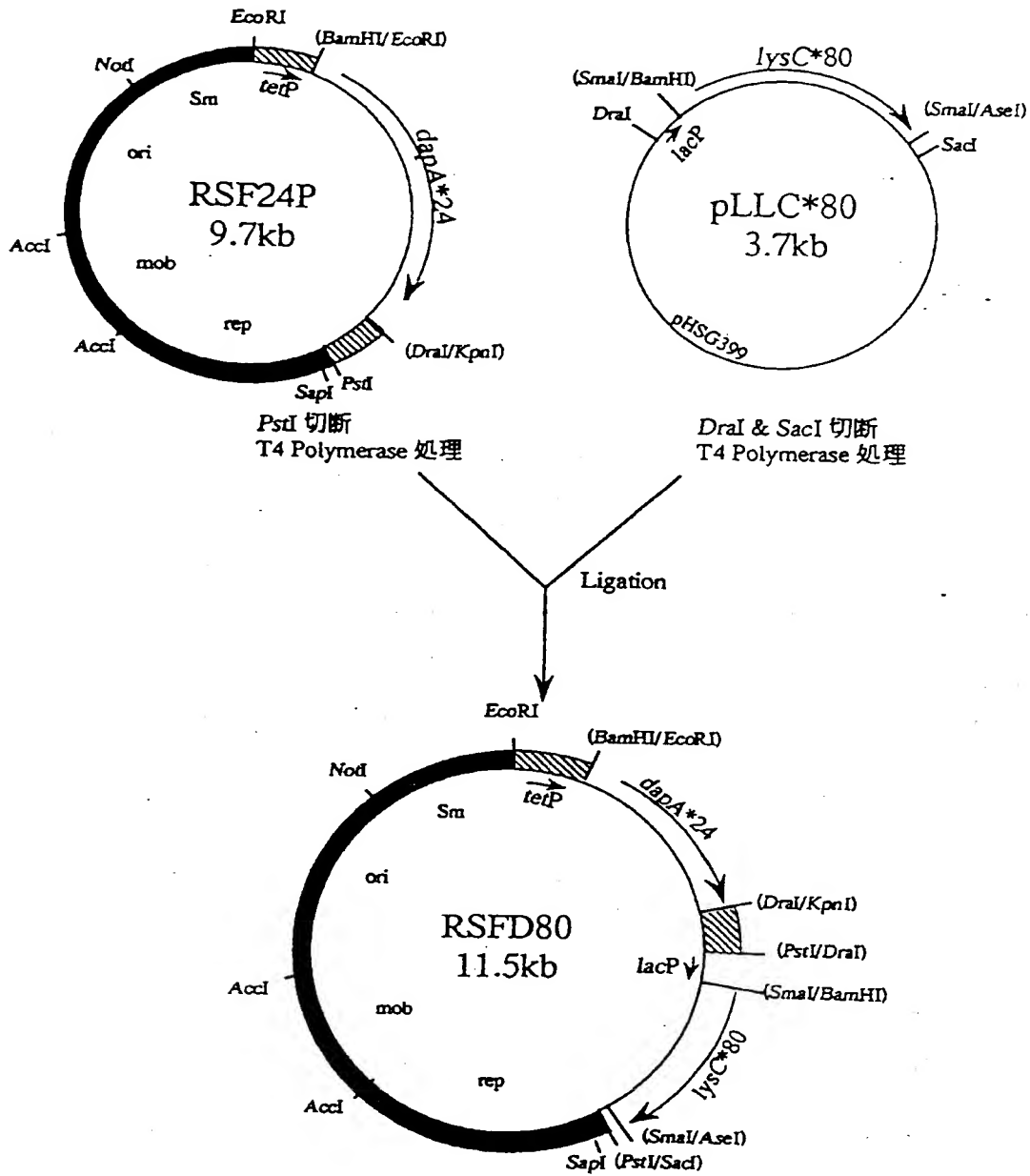
【図 7】 lysA遺伝子を保持するE. coli形質転換株のジアミノピメリン酸脱炭酸酵素活性を示す図。

【書類名】 図面

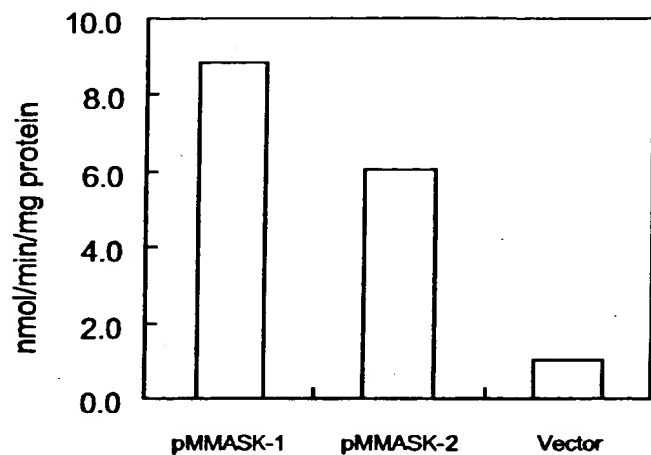
【図 1】



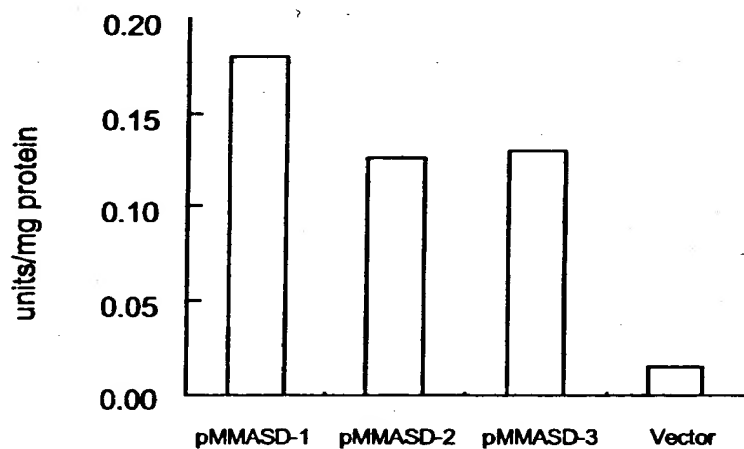
【図 2】



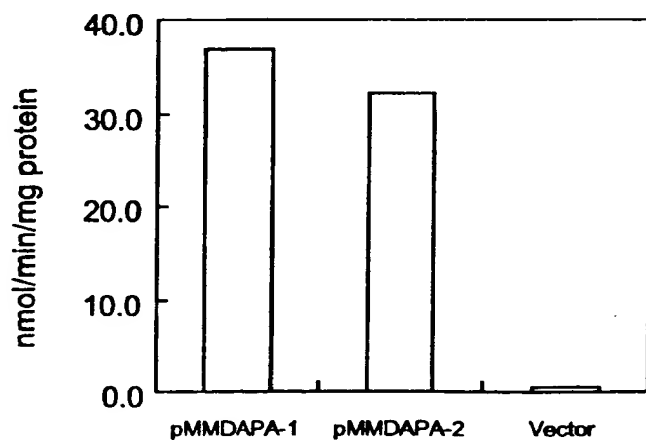
【図 3】



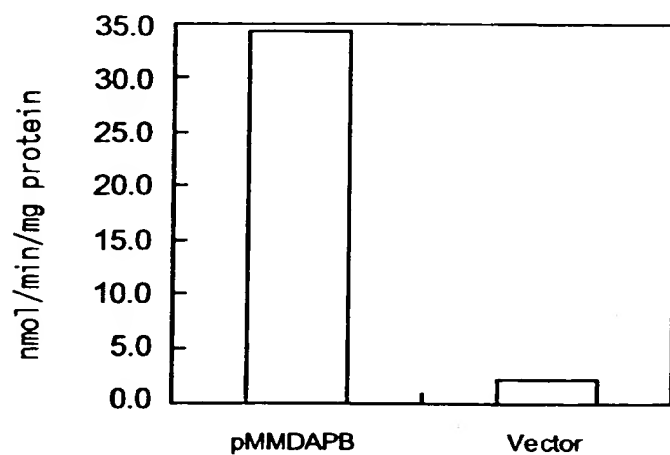
【図 4】



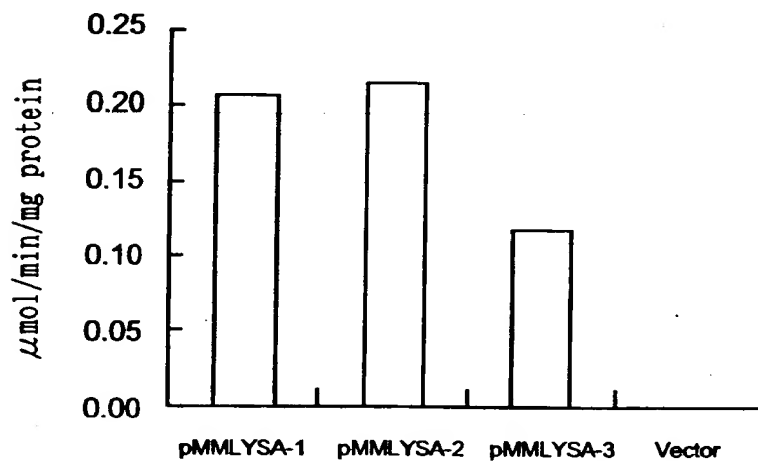
【図 5】



【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 メタノールを主炭素源として発酵法によりＬ－アミノ酸を効率よく生産する微生物、及び同微生物を用いてＬ－アミノ酸を製造する方法を提供する。

【解決手段】 メタノールを主たる炭素源として生育することができ、かつ、Ｌ－アミノ酸生産能を有するメチロフィラス属細菌、例えば、Ｌ－リジンによるフィードバック阻害を受けないジヒドロジピコリン酸合成酵素をコードするDNAと、Ｌ－リジンによるフィードバック阻害を受けないアスパルトキナーゼをコードするDNAとが細胞内に導入されて形質転換されたことにより、ジヒドロジピコリン酸合成酵素活性及びアスパルトキナーゼ活性が増強されたメチロフィラス属細菌、又はカザミノ酸要求性となったメチロフィラス属細菌を、メタノールを主たる炭素源とする培地に培養し、該培養物中にＬ－リジン等のアミノ酸を生産蓄積させ、該培養物からＬ－アミノ酸を採取することにより、Ｌ－アミノ酸を製造する。

【選択図】 図2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日 1991年 7月 2日

[変更理由] 住所変更

住 所 東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名 味の素株式会社